

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

**AVALIAÇÃO DAS INTER-RELAÇÕES ENTRE FUNÇÃO CARDIOPULMONAR E
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO DIABETES MELLITUS**

CRISTINA DE OLIVEIRA FRANCISCO

Orientadora: Angela Merice de Oliveira Leal

Co-Orientadora: Aparecida Maria Catai

São Carlos

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

CRISTINA DE OLIVEIRA FRANCISCO

**AVALIAÇÃO DAS INTER-RELAÇÕES ENTRE FUNÇÃO CARDIOPULMONAR E
MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO DIABETES MELLITUS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisioterapia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Fisioterapia na área de concentração Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia do Sistema Músculo-esquelético.

Orientadora: Angela Merice de Oliveira Leal

Co-Orientadora: Aparecida Maria Catai

São Carlos

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F818ai Francisco, Cristina de Oliveira.
Avaliação das inter-relações entre função cardiopulmonar e mediadores inflamatórios no diabetes mellitus / Cristina de Oliveira Francisco. -- São Carlos : UFSCar, 2012.
85 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

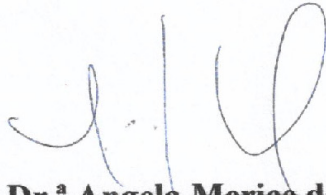
1. Diabetes mellitus. 2. Função pulmonar. 3. Ergoespirometria. 4. Inflamação. 5. Citocinas. I. Título.

CDD: 616.462 (20ª)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da banca examinadora para defesa de dissertação de mestrado de CRISTINA DE OLIVEIRA FRANCISCO , apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos, em 25 de Abril de 2012.

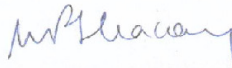
Banca Examinadora:



**Prof.ª Dr.ª Angela Merice de Oliveira Leal
(UFSCar)**



**Prof.º Dr.º Marcos de Carvalho Borges
(USP-Ribeirão Preto)**



**Prof.ª Dr.ª Mara Patrícia Traina Chacon-Mikahil
(UNICAMP)**

Investigação conduzida no Núcleo de Pesquisa em Exercício Físico (NUPEF) do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos e no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Apoio financeiro da Capes e da FAPESP

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos que acreditam
em um sonho e lutam para torna-lo realidade.*

AGRADECIMENTOS

Nada se constrói sem esforço. Grandes conquistas requerem muito trabalho. Terminar o mestrado é completar mais uma importante etapa da minha vida profissional e quem me acompanhou nessa jornada sabe que nem tudo foram flores, mas em nenhum momento estive sozinha para enfrentar os espinhos.

Tentarei formular meus agradecimentos em ordem cronológica, mesmo porque eu não saberia organizar de outra forma já que todos que irei citar foram importantes de uma forma única.

Minha jornada para o mestrado começou em 2009 quando terminei a graduação. Eu já havia definido que gostaria de seguir carreira acadêmica e ser pesquisadora, porém talvez aquele não fosse o momento certo, pois nesse ano não consegui ingressar na pós-graduação *stritu sensu*. Fiquei bastante perdida e desanimada, sem saber como perseguir o meu sonho. Nesse momento, meu namorado Marcel estava ao meu lado e me deu todo suporte necessário, me ajudando a ter direção e perseverança para seguir em frente. Seu auxílio não se limitou (e ainda não se limita) ao apoio psicológico, mas também a assessorias de inglês, discussões de artigo, meio de transporte (inúmeras vezes me emprestou o carro para ir coletar e levar meus experimentos para Ribeirão), e a paciência, muita paciência. Muitíssimo obrigada por ser tão especial! Eu tenho muita sorte de ter alguém, como você ao meu lado.

Meus pais (Rubens e Cleuda) também sempre apoiaram minhas escolhas, por mais estranhas que lhe parecessem. Muito obrigada a vocês, em especial a minha mãe pela enorme confiança e por sempre ter uma palavra de conforto nos momentos de desespero e pelo belo exemplo de perseverança que me mostrou durante a construção da sua própria história. Tenho muito orgulho da sua história! Obrigada também a minha irmã Elaine por preencher minha vida e trazer mais alegrias a ela com meus sobrinhos Yasmin e Daniel.

À professora Ana Cláudia que me estendeu a mão nos momentos mais difíceis. Muito obrigada pelas oportunidades e por sua amizade.

Aos meus amigos, que compartilharam comigo as tristezas e alegrias muito antes do mestrado se tornar uma realidade. É um presente maravilhoso a companhia de vocês. Obrigada pelos reencontros, pelas noites de jogatina, pelos treinos de pilates e caminhadas no kart e pelas conversas maravilhosas divididas nesses momentos.

À toda família Serikawa pela companhia. É um grande prazer conviver com vocês.

À professora Ângela Leal pela oportunidade e confiança no meu trabalho. Apreendi muito sob a sua orientação.

À professora Catai. Sua co-orientação foi um presente, pois ela é muito mais que uma co-orientadora, mas também “mãe” e amiga, sendo alguém que eu pretendo me espelhar.

À Silvia Cristina, que dividiu comigo a maioria das dificuldades. Nossa parceria nos rendeu uma bela amizade e lembranças muito marcantes dessa etapa. Fico muito feliz de ter tido oportunidade de conhece-la melhor!

À todos do NUPEF, que me receberam com o maior carinho. Um agradecimento especial a Luciana que nos treinou e ensinou a metodologia e a Juliana que sempre esteve presente e disposta a ajudar nos testes e triagens. Obrigada por toda colaboração!

Ao Dr. Sérgio Brasileiro que realizou boa parte das triagens. Obrigada por ser esse profissional maravilhoso e por respeitar os voluntários acima de tudo. Fico muito feliz de ver médicos como ele trabalhar!

À prof Heloísa Selistre e prof Márcia Commineti por permitir o uso de seus equipamentos, tornando possível a concretização desse trabalho de mestrado.

À Natália Allenspach pela competência e disposição em ajudar. É um privilégio poder contar com alguém como ela.

À Maria Aparecida (Ceci) e a Kelen pela imensa paciência e pela disponibilidade e vontade de ensinar. Sem o auxílio e os conhecimentos que elas me transmitiram esse trabalho não seria concretizado.

Ao pessoal do laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial a Patrícia e a Camila.

Ao Benê, que além de ser um profissional excelente e exibir muita paixão em realizar seu trabalho, tem um grande comprometimento em tudo que se propõe a fazer. É uma honra conviver com pessoas como ele.

À todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia da UFSCar, pelas grandes contribuições para meu crescimento profissional e pessoal.

A todos voluntários, pela disposição em participar, pelo comprometimento com a pesquisa e por tornar-la possível. Sem vocês, esse trabalho não passaria de uma idéia.

Aos órgãos de fomento, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Obrigada

“Os ideais que iluminaram o meu caminho são a bondade, a beleza e a verdade.”

Albert Einstein

RESUMO

O Diabetes Mellitus (DM) está associada a diversas complicações, incluindo redução do condicionamento físico e alteração da função pulmonar. O número de evidências sugerindo o envolvimento da inflamação sistêmica na fisiopatologia do DM e suas complicações é crescente. O objetivo do presente estudo foi avaliar o função cardiorespiratória em repouso e durante o exercício físico em indivíduos portadores de DM e verificar a sua relação com mediadores inflamatórios. Participaram do estudo 19 homens portadores de DM (51,16 anos \pm 5,92) e 19 controles saudáveis (48,79 anos \pm 7,47). As avaliações incluíam: teste de função pulmonar, teste de exercício cardiopulmonar com protocolo incremental em cicloergômetro, concentrações plasmáticas de lipídios e de HbA_{1c} e o perfil de produção intracelular de citocinas linfocitárias em sangue periférico. No teste de exercício verificamos que a potência máxima, frequência cardíaca pico (FC_{pico}), consumo de oxigênio no pico do exercício (VO_{2pico}) e no limiar de anaerobiose (VO_{2LA}) e a taxa de troca gasosa (RER) foram significativamente menores em indivíduos do grupo diabético. Não houve diferença entre os grupos em relação a idade, concentração plasmática de lipídios, proteína C-reativa (PCR), perfil de produção linfocitária das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17. Também não foram observadas diferenças entre os grupos no teste de função pulmonar, porém alterações nessas variáveis foram preditivas para DM. Concluindo, nossos resultados confirmam a redução da capacidade cardiopulmonar em indivíduos com DM. A inflamação sistêmica associada ao DM pode ser influenciada por outros fatores ausentes na amostra estudada. Adicionalmente, os dados sugerem anormalidades espirométricas como fatores preditivos para o diabetes mellitus.

Palavras-chave: diabetes mellitus, função pulmonar, teste de exercício cardiopulmonar, inflamação, citocinas

ABSTRACT

Diabetes Mellitus (DM) is associated with many complications, including impairment of cardiorespiratory fitness and pulmonary function. Increasing evidences has suggested that comorbidities and systemic inflammation may be involved. The objective of this study was to evaluate cardiorespiratory function in rest and exercise in adults with DM and to verify the relationship between inflammation. Nineteen men with diabetes (51,16 years \pm 5,92) and nineteen control subjects (48,79 years \pm 7,47) were studied. All individuals were subjected to incremental cardiopulmonary exercise test in cycle ergometer, spirometry, intracellular cytokine lymphocyte profile, lipid and c-reactive protein (CRP) plasma concentration. In the exercise test, maximal overload (W), peak heart rate (HR_{peak}), oxygen consumption at peak (VO_{2peak}) and at anaerobic threshold (VO_{2AT}), respiratory exchange ratio (RER) were significantly lower in patients with DM than in control subjects. Control subjects and individuals with DM were not different in age, blood pressure, lipid and CRP plasma concentration and intracellular cytokine lymphocytes production of TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-17. No significant differences were noted in pulmonary function variables, but abnormalities in these data were predictors to DM. In conclusion, the results confirm impairment of the cardiopulmonary fitness in subjects with DM. The inflammation associated with DM might be influenced by other factors absent in our sample. In addition, the data suggest spirometric abnormalities as predictive to diabetes mellitus

Keywords: Diabetes Mellitus, pulmonary function, cardiopulmonary exercise test, inflammation, cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Procedimento experimental: voluntário durante o teste de função pulmonar

Figura 2. Representação esquemática do teste de exercício físico dinâmico contínuo do tipo

Figura 3. Procedimento experimental: voluntário durante o teste de exercício cardiopulmonar em cicloergômetro

Figura 4. Diagrama demonstrativo da distribuição da amostra

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

Tabela 2. Teste de função pulmonar

Tabela 3. Regressão logística das variáveis espirométricas.

Tabela 4. Parâmetros do teste de exercício cardiopulmonar

Tabela 5. Regressão logística das variáveis do teste de exercício cardiopulmonar

Tabela 6. Porcentagem de expressão de citocinas nos linfócitos T

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------|---|
| CI | Capacidade inspiratória |
| CVF | Capacidade vital forçada |
| CVL | Capacidade vital lenta |
| DAC | Doença arterial coronariana |
| DM | Diabetes mellitus |
| DM1 | Diabetes mellitus tipo 1 |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo 2 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPOC | Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica |
| FEF ₁ | Fluxo expiratório forçado no primeiro segundo |
| FEF _{25-75%} | Fluxo expiratório forçado 25-75% |
| FEF _{máx} | Pico de fluxo expiratório |
| GC | Grupo controle |
| GDM | Grupo diabético |
| HbA _{1c} | Hemoglobina glicosilada |
| HDL | Lipoproteína de alta densidade |
| IFN- γ | Interferon gama |
| IL | Interleucina |
| IMC | Índice de massa corpórea |
| LA | Limiar de anaerobiose |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade |
| PBS | Tampão fosfato salina |

| | |
|---------------------|---|
| PCR | Proteína C-reativa |
| PETCO ₂ | Pressão Parciais de CO ₂ ao final da expiração |
| PETO ₂ | Pressão Parciais de O ₂ ao final da expiração |
| PMA | Forbol-miristato-acetato |
| RER | Taxa de troca gasosa |
| RVVM | Razão entre ventilação voluntária máxima absoluta sobre a predita |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral Alfa |
| VC | Volume Corrente |
| VCO ₂ | Liberação de gás carbônico |
| VE | Ventilação Pulmonar |
| VE/VCO ₂ | Equivalente ventilatório de CO ₂ |
| VE/VO ₂ | Equivalente ventilatório de O ₂ |
| VO ₂ | Consumo de oxigênio |
| VO _{2LA} | Consumo de oxigênio no limiar de anaerobiose |
| VO _{2pico} | Pico de consumo de oxigênio |
| VVM | Ventilação voluntária máxima |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Diabetes Mellitus | 2 |
| 1.2 Alterações cardiopulmonares associadas ao DM | 4 |
| 1.3 Anormalidade imunológicas associadas ao DM | 9 |
| 1.3.1 Proteína C-Reativa | 10 |
| 1.3.2 Linfócitos T e produção de citocinas | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 14 |
| 2.1 Objetivos gerais | 15 |
| 2.2 Objetivos específicos | 15 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 16 |
| 3.1 Critérios de inclusão | 17 |
| 3.2 Procedimento experimental | 18 |
| 3.2.1 Avaliação da porcentagem de gordura corporal- Bioimpedância | 19 |
| 3.2.2 Coleta de amostra de sangue | 19 |
| 3.2.2.1 Isolamento e congelamento de células mononucleares do sangue periférico | 20 |
| 3.2.2.2 Determinação ultra-sensível da concentração plasmática de Proteína C-Reativa (PCR) | 20 |
| 3.2.2.3 Determinação de Hemoglobina Glicada (HbA _{1c}) e concentrações plasmáticas de lipídeos | 20 |
| 3.2.3 Teste de Função Pulmonar - Espirometria | 21 |
| 3.2.4 Teste Cardiopulmonar | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.5 Detecção de citocinas intracelulares em linfócitos T | 27 |
| 3.2.5.1 Descongelamento das células mononucleares | 27 |
| 3.2.5.2 Quantificação por citometria de fluxo | 28 |
| 3.3 Análise Estatística | 30 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 5. DISCUSSÃO | 39 |
| 6. CONCLUSÕES | 48 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |
| 8. APÊNDICES E ANEXOS | 65 |
| APÊNDICE A – Manuscrito submetido ao periódico <i>Diabetes Research and Clinical Practice</i> | 66 |
| APÊNDICE B - Análise e expressão de citocinas intracelulares em linfócitos | 81 |
| APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido | 83 |
| ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos | 84 |

1.INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

Na última década, o diabetes mellitus (DM) se tornou um importante problema de saúde pública de ordem mundial, por sua alta frequência na população, suas complicações, elevada mortalidade, altos custos financeiros e sociais envolvidos no seu tratamento e a deterioração significativa da qualidade de vida dos seus portadores (1; 2). O aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade está associado ao crescente número de casos de DM (3; 4).

O DM é uma síndrome metabólica cujo marco clínico é a hiperglicemia, mas que se constitui em desordem do metabolismo não só de carboidratos, como também de proteínas e lipídios. As duas principais formas clínicas são o DM tipo 1 (DM1), que decorre da destruição imunológica das células β pancreáticas causando a ausência do hormônio pancreático insulina, e o DM tipo 2 (DM2) causado pela produção deficiente da insulina e/ou resposta ineficiente dos tecidos sensíveis a ela (5; 6) e responsável por 90 a 95% dos casos (7).

A incidência e prevalência do DM2 estão aumentando, alcançando proporções epidêmicas. Espera-se que de 2000 a 2030 duplique o número de indivíduos diabéticos no mundo, sendo este aumento acompanhado de mudanças na distribuição demográfica, com crescimento da proporção de indivíduos com idade superior a 65 anos (8), visto que atualmente a maioria dos diabéticos possuem idade entre 45 e 64 anos (9).

No Brasil, os dados de prevalência do DM2 são semelhantes aos da Europa e Estados Unidos. Segundo uma estimativa recente referente a prevalência global de diabetes, em 2000 o Brasil ocupava a oitava posição em número de casos de DM (aproximadamente 4,6 milhões), prevendo-se que em 2030 o país passe a ocupar a sexta posição com aproximadamente 11,3 milhões de casos (8). Localmente, um estudo com a população urbana de São Carlos observou prevalência de 13,5% de DM na população com idade de 30 a 79 anos, sendo superior a observada em estudos nacional e regional prévios (10).

Diversas complicações estão associadas ao DM, dentre elas: hipertensão, dislipidemia, microangiopatia, macroangiopatia, aterosclerose, neuropatias diversas (4; 11), redução do condicionamento cardiopulmonar (12) e redução da função pulmonar (13). A hiperglicemia prolongada no DM causa uma variedade de alterações patológicas em pequenos vasos, artérias e nervos periféricos, afetando primariamente as células do endotélio vascular, além de levar ao aumento na produção de espécies reativas do oxigênio que causam lesões oxidativas (14). O aumento na formação de derivados glicosilados estimula a elevação do fluxo de glicose na via das aldose-redutases, resultando em acúmulo de sorbitol, que em grande quantidade possui efeitos tóxicos que provocam a desmilenização segmentar e lesão axonal irreversível dos nervos (14). Algumas evidências indicam que a hiperglicemia é o principal fator na iniciação e progressão de complicações microvasculares associadas ao DM (15).

A hiperglicemia e o aumento de ácidos graxos livres, triglicérides e aminoácidos no estado de jejum, além de ocasionar alteração qualitativa no perfil lipídico, com predomínio de LDL, está associado ao maior risco de aterosclerose e doenças cardiovasculares (16; 17). Além disso, o DM é associado a menor sensibilidade baroreflexa e resposta cronotrópica anormal, alterando a regulação da frequência cardíaca (18). O risco de doença cardiovascular é quatro vezes maior em indivíduos diabéticos comparado a não diabéticos (17).

A associação entre DM e doenças cardiovasculares, que englobam isquemia miocárdica, obstrução arterial periférica e doença vascular cerebral, são as principais causas de mortalidade nessa população. O aumento da prevalência do DM ocasionará de maneira inevitável o crescimento da proporção de mortes por doenças cardiovasculares e outras complicações (8).

1.2 Alterações cardiopulmonares associadas ao DM

Disfunções cardiopulmonares em pacientes diabéticos assintomáticos são mais prevalentes do que é geralmente documentado (15). A redução do desempenho no exercício é um importante preditor de eventos cardiovasculares em toda população (19) e indivíduos diabéticos possuem com frequência, menor tolerância ao esforço físico (20). O condicionamento físico é um forte preditor de mortalidade de homens diabéticos (21) independente da idade (22).

A capacidade de realizar exercício depende de inúmeros fatores como: atividade neuromuscular, hemodinâmica, mecânica ventilatória, trocas gasosas, metabolismo energético e respostas hormonais. Alterações em qualquer um desses fatores pode se refletir na menor tolerância ao esforço físico (23; 24).

O órgão efetor para a desempenho no exercício físico é o músculo. O trabalho muscular requer respostas fisiológicas dos sistemas cardiovascular e pulmonar acoplados com o aumento da taxa metabólica. A eficiência desse sistema requer (24):

- apropriada estrutura intracelular, substrato energético e concentrações enzimáticas;
- capacidade de ejeção cardíaca para prover a quantidade de sangue oxigenado necessário para sustentar a produção energética;
- Concentração adequada de hemoglobina no sangue;
- Circulação pulmonar efetiva e ventilação apropriada para garantir a oxigenação do sangue;
- Mecanismos pulmonares fisiológicos e elasticidade da caixa torácica;
- Mecanismos de controle ventilatório capazes de regular as tensões de gás arterial e pH.

O teste de exercício cardiopulmonar fornece informações referentes às respostas metabólicas, ventilatórias e cardiovasculares durante o exercício dinâmico e sua natureza não invasiva o torna uma ferramenta de grande interesse, visto seu importante potencial diagnóstico e prognóstico (24; 25).

O uso de protocolos incrementais, que consiste no aumento de carga progressiva, em testes de exercício cardiopulmonar é muito útil para definir a tolerância ao exercício e seus fatores limitantes e estimar o limiar de anaerbiose (LA) e outros componentes da resposta submáxima ao esforço progressivo (25).

O teste de exercício cardiopulmonar fornece informações sobre o consumo de oxigênio (VO_2), liberação de gás carbônico (VCO_2), volume-minuto expirado (também denominado ventilação pulmonar, VE), pressões parciais de O_2 e de CO_2 ao final da expiração ($PETO_2$ e $PETCO_2$, respectivamente), volume corrente (VC) e frequência respiratória, além do comportamento de parâmetros cardiovasculares como frequência cardíaca (FC) e pressão arterial (PA).

O consumo de oxigênio (VO_2) representa a taxa de utilização corporal desse gás, podendo ser limitado pela capacidade de oferecer oxigênio, transporte sanguíneo ou pela capacidade de captação no músculo. Durante o exercício, ocorre uma elevação linear do VO_2 , VE e VCO_2 . A partir do LA, ocorre a mudança das trocas gasosas para compensar a acidose metabólica ocasionada pela liberação de ácido láctico pelos músculos. Este limiar marca a mudança do metabolismo de fonte energética com predominância aeróbia para um metabolismo preponderantemente anaeróbio, caracterizado por um aumento mais expressivo do VCO_2 e VE em relação ao VO_2 . O LA tem sido amplamente usado como marcador de aptidão cardiopulmonar. Durante o exercício incremental, o pico do consumo de oxigênio (VO_{2pico}) geralmente resume os processos que estão ocorrendo no sistema de transporte desse gás, sendo empregada como medida representativa da adequação cardiopulmonar (25; 26).

Além do comportamento do VO_2 , VCO_2 e VE, a análise das respostas ventilatórias e metabólicas também é realizada por meio das relações entre essas variáveis. A razão VCO_2/VO_2 , por exemplo, reflete a taxa de troca gasosa (RER), fornecendo informações sobre o tipo de

metabolismo utilizado como fonte energética e como indicador de exercício máximo (27). A relação entre a ventilação pulmonar, captação de oxigênio e liberação de gás carbônico (VE/VO_2 e VE/VCO_2) são denominadas equivalentes ventilatórios. Estes equivalentes são utilizados para auxiliar na detecção não invasiva do limiar de anaerobiose pelo método ventilatório. Além disso, esses equivalentes (em especial o VE/VCO_2), no momento do LA, têm sido utilizados como indicadores da eficiência ventilatória (25).

Muitos estudos têm demonstrado redução da capacidade de exercício associado ao DM (3; 19; 28; 29). A diferença do pico de consumo de oxigênio ($VO_{2\text{pico}}$) entre pessoas saudáveis e diabéticos chega a aproximadamente 20% (28). A redução significativa do condicionamento cardiopulmonar (3; 19) e os menores valores de $VO_{2\text{pico}}$ em testes de exercício têm sido associados com múltiplos fatores envolvidos nas complicações do diabetes (19), dentre eles: disfunção ventricular esquerda (30), alterações na perfusão cardíaca e menor resposta da frequência cardíaca durante exercício submáximo pela neuropatia autonômica (15; 18), alterações qualitativas no transporte de oxigênio em associação a redução na cinética do VO_2 (31), elevado requerimento ventilatório durante o exercício incremental (15; 31), redução da difusão dos gases e limitações na capacidade volumétrica do pulmão e no fluxo respiratório de ar (23). Entretanto, os mecanismos envolvidos nessas alterações ainda não estão totalmente esclarecidos (28; 29; 32).

O DM está associado à redução da extração periférica do oxigênio (33). A hiperglicemia tem influência negativa em importantes parâmetros associados com a regulação do transporte de oxigênio e sua utilização (18). O controle glicêmico inadequado desloca a curva de dissociação da oxihemoglobina, reduzindo sua afinidade com o oxigênio (24).

Brassard e colaboradores (18) observaram que a redução da VE durante o exercício submáximo estava associada a altos valores de HbA_{1c} , atribuindo esses resultados ao negativo

impacto da hiperglicemia nas estruturas pulmonares. Indivíduos portadores de DM possuem um padrão respiratório alterado devido a mudanças no quimiorreflexo periférico o que modifica negativamente a hiperpnéia do exercício (34). Além disso, autópsias em pulmões de indivíduos com DM revelaram espessamento do epitélio alveolar e da lâmina capilar basal e microangiopatia (35-38) que afetam as trocas gasosas pulmonares contribuindo para redução da eficiência ventilatória (38-40) e da capacidade de difusão (38).

Em relação a função pulmonar estática, 60% dos adultos portadores de DM possuem alterações deletérias nos volumes e capacidades pulmonares (36; 41; 42), estando estas associadas à glicosilação do colágeno do tórax e parênquima pulmonar induzida pelas concentrações cronicamente elevadas de glicose no sangue (36; 40; 43).

A redução da função pulmonar tem sido observada em diabéticos tipo 1 e 2 através de provas de função pulmonar. Essas provas oferecem informações indiretas sobre a resistência elástica, distensão do sistema respiratório e a força muscular motora além de auxiliar no diagnóstico e quantificação dos distúrbios ventilatórios obstrutivos e restritivos. O defeito ventilatório restritivo refere-se à redução dos volumes pulmonares, podendo ser ocasionada pela obesidade, aumento da rigidez pulmonar, doenças da parede torácica e anormalidades neuromusculares. Por outro lado, nas doenças obstrutivas, os volumes estão aumentados, porém de forma desproporcionada, ocorrendo obstrução das vias aéreas, hiperinsuflação dinâmica, perda de retração elástica e adaptações musculares e esqueléticas da parede torácica (27).

As provas de função pulmonar são testes confiáveis, validados e relativamente simples podendo ser usados tanto com fins clínicos como em pesquisas. Em indivíduos portadores de DM esses testes são indicados para determinação de danos da função pulmonar e elucidação da história natural da doença e sua causalidade (44).

Comumente portadores de DM apresentam redução da capacidade vital forçada (CVF) e do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1). Esse padrão tem sido diretamente relacionado com a hiperglicemia (45; 46). Um estudo de Davis e colaboradores (45) forneceu evidências referentes à associação das complicações do DM com reduções dos volumes pulmonares e limitações do fluxo de ar, demonstrando ainda que a exposição à hiperglicemia é um forte e consistente preditor negativo de função pulmonar. Minette e colaboradores (38), observaram que alterações da difusão encontradas em idosos sedentários portadores de DM estavam relacionadas com a idade de aparecimento da doença. O padrão obstrutivo também tem sido relatado e associado à inflamação sistêmica (47; 48).

A capacidade pulmonar diminui progressivamente após 25 anos de idade, independentemente da aptidão física (49), porém o DM ocasiona uma perda extra (cerca de 10%) (45). Isto pode reduzir a reserva funcional respiratória além do limiar mínimo necessário para aumentar o consumo alveolar de oxigênio em resposta ao exercício, ocasionando hipóxia tecidual e aumentando os riscos de efeitos adversos da evolução clínica (40). A redução de 10% da função pulmonar está associada com aumento de 12% em todas as causas de mortalidade em diabéticos (45) provavelmente devido à perda cumulativa de reserva pulmonar associar-se a angiopatia em órgãos distantes e, eventualmente, agravarem a hipóxia tecidual (40).

Independente da natureza dos distúrbios ventilatórios, eles afetam diretamente a capacidade de realização de exercício e comumente estão associados à intolerância ao esforço, reduzindo significativamente a qualidade de vida. Alguns autores atribuíram à inflamação um importante papel para explicar as associações entre o DM e a redução da função pulmonar (3; 50; 51). A inflamação sistêmica sub-clínica também pode estar associada a limitação ao exercício estando relacionada aos mecanismos responsáveis por alterações micro e macro-vasculares (19; 52).

1.3 Anormalidades imunológicas associadas ao DM

Atualmente é reconhecida a relação entre anormalidades metabólicas e imunológicas associadas ao diabetes mellitus tipos 1 e 2 e às suas complicações (53; 54). A resistência à insulina e o DM são considerados estados de inflamação sub-clínica (55), estando tipicamente associados à presença de marcadores inflamatórios (3; 12). Segundo Moreno e colaboradores (56), pacientes diabéticos possuem maior atividade inflamatória do que a população em geral.

Recentemente, pesquisas têm demonstrado o importante papel da insulina como agente imuno-modulador, possuindo um rápido e potente efeito anti-inflamatório em nível celular e molecular (57; 58). Dandona e colaboradores (58) observaram em seu estudo *in vivo* que uma pequena dose de insulina é capaz de induzir um significativo efeito anti-inflamatório em aproximadamente 2 horas. A deficiência de insulina está intimamente associada às alterações da imunidade do DM e sua maior suscetibilidade à infecções (59).

Outro fator de grande influência na imunidade de diabéticos é a hiperglicemia, que afeta negativamente as células imuno-competentes (60). A hiperglicemia crônica induz a glicação protéica que pode estimular a produção de citocinas envolvidas na ativação do sistema imunológico (60; 61). Comorbidades como a hipertensão arterial e dislipidemia agem em conjunto com a hiperglicemia, exacerbando a reação inflamatória. Os mediadores inflamatórios são responsáveis por ativar inúmeros receptores e fatores de transcrição que levam à disfunção e apoptose das células beta pancreáticas e resistência a insulina. Além disso, a inflamação está associada a alterações endoteliais em pequenos e grandes vasos (54).

Em um estudo longitudinal, Vozarova e colaboradores (62) observaram que o aumento da quantidade de leucócitos foi um fator preditivo para o desenvolvimento do DM2, estando inversamente correlacionada a sensibilidade insulínica independentemente do grau de obesidade. Visto que, o aumento da quantidade de leucócitos indica a ativação do sistema imunológico e

inflamação, o estudo concluiu que o declínio na sensibilidade a insulina pode ser causada pela ativação do sistema imune, o que por sua vez contribui para o desenvolvimento do DM2.

A participação das citocinas inflamatórias na fisiopatologia do DM é bem aceita (33; 53; 54) entretanto os mecanismos das alterações do sistema imune-celular no DM bem como as citocinas envolvidas ainda não estão definidos.

1.3.1 Proteína C-Reativa

Aumentos nos níveis da proteína C-reativa (PCR) têm sido descritos em sujeitos com diabetes, síndrome metabólica e obesidade (63; 64) relacionando-se positivamente com os níveis HbA_{1c} (65). A PCR é um forte preditor do desenvolvimento de DM2 em ambos os sexos (66) independente do índice de massa corpórea (IMC) (67-69) sendo considerado um mediador chave na resposta inflamatória (69). Durante o quadro de intolerância à glicose, os níveis de PCR e citocinas pró-inflamatórias elevadas predizem a conversão para o DM2 (70; 71), sendo que o aumento da expressão da PCR é, provavelmente, secundário à resistência a insulina (72).

Lee e colaboradores (73) observaram que a síndrome metabólica juntamente com elevados níveis de PCR estava associada com a redução da capacidade vital forçada (CVF) e que indivíduos com esse quadro possuíam maior risco de desenvolver doenças pulmonares e cardiovasculares. A piora da função pulmonar parece estar relacionada à inflamação sistêmica encontrada em indivíduos diabéticos (44).

O baixo condicionamento cardiorrespiratório também tem sido associado aos níveis elevados de PCR. McGavock e colaboradores (72) observaram que o baixo condicionamento físico estava relacionado ao PCR elevado e pobre controle glicêmico em diabéticos. Os níveis de condicionamento físico são inversamente associados ao PCR (74) e esses níveis possuem

impacto direto no risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares em homens com e sem DM2 (75).

O PCR prediz, independentemente, o risco de eventos cardiovasculares na população geral (70; 76), sendo considerado um marcador inflamatório com grande potencial clínico, ajudando a identificar fatores de risco em indivíduos aparentemente saudáveis e em sujeitos diabéticos sem complicações, podendo ser utilizado como avaliação preventiva (54).

1.3.2 Linfócitos T e produção de citocinas

O defeito imunológico mais dramático no DM é a alteração na função das células T (77) que tem um importante papel na suscetibilidade a infecções relacionadas a essa população (78). Anormalidades nos linfócitos T e variações em sua quantidade tem sido descritas em estudos com diabéticos com pobre controle glicêmico (59; 60). Os linfócitos T são células do sistema imune envolvidas na resposta humoral (Th1) e celular (Th2). Sua funcionalidade está relacionada à capacidade de defesa do organismo e ao desenvolvimento de doenças auto-imunes.

A insulina é um hormônio imuno-modulador. No linfócito T, esse hormônio possui importante papel na ativação e manutenção do estado operativo dessas células, os quais apresentam receptores de insulina similares ao encontrado em tecidos como fígado, músculo, fibroblastos e tecido adiposo, sendo sensíveis a mudanças na concentração da insulina (59). Fatores metabólicos estão envolvidos em anormalidades na função e na redução da quantidade dos linfócitos T e a hipoinsulinemia parece ser a razão desses defeitos (60). O pobre controle glicêmico também parece ser responsável pelas alterações destes (59), influenciando negativamente as células imuno-competentes.

Após a ativação, os linfócitos T podem se diferenciar em células polarizadas para o padrão Th1 ou Th2 de resposta imune. Seus clones demonstram padrões distintos de síntese de

citocinas. O padrão Th1 refere-se à imunidade mediada por células, enquanto o padrão de resposta imunológica Th2 é essencial para a imunidade humoral (79). A produção de citocinas inflamatórias por linfócitos tem sido associada à patogênese do DM (80), contudo as evidências que relacionam o desenvolvimento da doença com os modelos de resposta imunológica Th1 ou Th2 são controversos (81), gerando questionamentos em relação ao tipo de resposta imune e as citocinas envolvidas.

Em relação ao padrão Th1, duas citocinas produzidas por linfócitos (dentre outras células), parecem bastante relacionadas ao desenvolvimento do DM: o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o interferon gama (IFN- γ). O TNF- α tem sido considerado fundamental para o desenvolvimento da resistência a insulina e redução da sua secreção pelas células β do pâncreas (57). A administração de TNF- α em pessoas saudáveis induz a hiperglicemia sem alterar os níveis insulínicos (82). Essa citocina estimula a lipólise, aumentando as concentrações plasmáticas de triglicérides e reduzindo o catabolismo e excreção hepática do colesterol. O TNF- α também está envolvido no aumento de outras citocinas inflamatórias (70).

Assim, o aumento dos níveis de TNF- α contribui para o desenvolvimento dos distúrbios do metabolismo da glicose e para o desenvolvimento de resistência a insulina além de estar envolvido com o aumento do risco cardiovascular e subsequente aumento da morbidade e mortalidade devido às modificações do metabolismo lipídico causadas por ele (70).

Por outro lado no DM2 parece haver baixos níveis de IFN- γ (80). Essa citocina possui papel importante na estimulação da proliferação e diferenciação de monócitos e células *Natural Killer* (NK). Sua deficiência aumenta a suscetibilidade a infecções (83).

Outras citocinas linfocitárias que têm ganhado notoriedade devido a suas possíveis relações com o DM são a interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10), do padrão Th2 de resposta imune. Ambas são consideradas citocinas anti-inflamatórias, embora haja evidências de

que a IL-10 também possui um efeito pró-inflamatório (84). A IL-4 parece influenciar o metabolismo da glicose e lipídios promovendo a sensibilidade a insulina e tolerância a glicose (85). Já a IL-10 é capaz de inibir a produção de citocinas do padrão Th1 sendo também responsável por mediar e iniciar a resposta imune humoral (84). O papel da IL-10 no desenvolvimento do diabetes é complexo. Manirarona e colaboradores (86) observaram, em seu estudo experimental com ratos NOD, que a IL-10 está envolvida com a patogênese e prevenção do diabetes. A presença dessa citocina no pâncreas e baço acelerava o desenvolvimento do DM. Por outro lado, o mesmo estudo verificou que a injeção intra-peritoneal e intra-muscular apresentou papel protetor, bloqueando a produção de citocinas pró-inflamatórias, prevenindo contra o desenvolvimento da doença.

Estudos recentes têm mostrado o papel da interleucina 17 (IL-17) no metabolismo da glicose e sua contribuição na patogênese da hipertensão, aterosclerose e obesidade (87; 88). Essa citocina é produzida por linfócitos T, especificamente pelas células T helper, estando envolvidas em um terceiro padrão imunológico denominado Th17, o qual tem sido estudado recentemente, havendo diversas dúvidas em relação a sua função (89). Altas concentrações de IL-17 tem sido associado a inflamação crônica e desordens do sistema imunológico (90), porém sua participação no desenvolvimento do DM2 tem sido pouco explorado.

Muitas dúvidas permanecem em relação ao papel da inflamação na fisiopatologia do diabetes mellitus. As citocinas envolvidas e o padrão imunológico responsável pela inflamação em doenças metabólicas também não estão elucidados, justificando a realização do presente estudo.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar o função cardiopulmonar em repouso e durante o exercício físico em indivíduos portadores de DM e verificar a sua relação com mediadores inflamatórios.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar em indivíduos diabéticos e em controles saudáveis:

1. Volumes e capacidade pulmonares.
2. Resposta das variáveis cardiorrespiratórias, ventilatórias e metabólicas ao exercício físico.
3. Concentrações plasmáticas de Proteína C-reativa.
4. Perfil de produção intracelular de citocinas linfocitárias em sangue periférico.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular - Núcleo de Pesquisa em Exercício Físico (NUPEF) do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Os indivíduos que atenderam os critérios de inclusão do estudo e após todos esclarecimentos referentes aos procedimentos experimentais concordaram em participar mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (apêndice C) conforme a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Este estudo de pesquisa, foi aprovado, pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar (parecer nº 412/2010) (anexo 1).

A divulgação da pesquisa foi realizada através de cartazes distribuídos na rede de saúde de São Carlos e divulgação no site da Universidade Federal de São Carlos. Todos os indivíduos com diagnóstico clínico de diabetes mellitus que manifestaram interesse em colaborar com a pesquisa foram convidados a participar do Programa de Atenção ao Diabetes da Unidade Saúde Escola – UFSCar, o qual oferece assistência médica, nutricional, psicológica e física gratuitas por uma equipe multidisciplinar composta por profissionais qualificados. Os indivíduos saudáveis receberam orientações sobre os resultados dos testes realizados e prevenção do diabetes mellitus.

3.1 Critérios de inclusão

- Ser do sexo masculino
- Ter idade entre 40 a 65 anos
- Ser Sedentário, apresentando classificação funcional aeróbia considerada muito fraca, fraca ou razoável segundo a American Heart Association (91)

- Não ser tabagista
- Não ser etilista
- Não utilizar medicamentos inaláveis
- Ausência de quaisquer doenças do sistema respiratório
- Ausência de doenças do músculo esquelético que impedissem a realização dos testes
- Ausência de doença inflamatória ativa, aguda ou crônica
- Ausência de indícios de isquemia miocárdica e/ou doenças cardiovasculares, ao exame clínico e teste ergométrico, que contra-indicassem a participação no presente estudo. O exame clínico e teste ergométrico foram realizado por médico cardiologista juntamente com a pesquisadora na Unidade Saúde Escola da Universidade Federal de São Carlos (USE).
- Grupo diabético (GDM): diagnóstico de diabetes mellitus segundo critérios da American Diabetes Association (92)
- Grupo Controle (GC): ausência de diabetes segundo os critérios acima mencionados, ausência de obesidade segundo os pontos de corte do Índice de Massa Corpórea (IMC) recomendados pela OMS para a população adulta (93) e ausência de hipertensão arterial sistêmica segundo os critérios da V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial (94).

3.2 Procedimento experimental

A triagem dos voluntários foi realizada de maneira sequencial e aleatória. Os procedimentos experimentais com cada voluntário foram conduzidos em apenas uma manhã, com início às 8 horas, em data previamente agendada. Os voluntários foram orientados a não praticar atividades físicas intensas e a não ingerir alimentos e bebidas estimulantes no dia anterior ao teste. Também foram informados, previamente, a manter a utilização de suas medicações de uso regular e a comparecer em jejum de 8-12 horas, com vestimenta adequada à

prática de atividade física. Caso o voluntário não atendesse às recomendações, o teste era transferido para outra data.

No dia do experimento, a sala de teste era previamente preparada antes de cada procedimento, mantendo-se a temperatura entre 22° a 24° Celsius e a umidade relativa do ar entre 50 e 60%. Utilizou-se termohigrômetro (Templec™) para a medição dos valores de temperatura e umidade relativa do ar. A temperatura foi controlada artificialmente por um aparelho de ar condicionado modelo *Mini Split* (TEMPSTAR®). Antes dos experimentos foram realizados os procedimentos de calibração de todos os equipamentos, bem como a organização de todos os utensílios e acessórios necessários para os testes.

3.2.1 Avaliação da porcentagem de gordura corporal - Bioimpedância

A porcentagem de gordura corporal total foi avaliada nos voluntários em jejum pelo método de bioimpedância pela técnica descrita por Lukaski (95), por meio de um monitor de composição corporal quadripolar (Tanita Corporation of America Inc, Illinois, USA). Os voluntários eram orientados a retirar todos os objetos de metal que pudessem estar utilizando e a permanecer descalço sobre a plataforma do aparelho segurando as alças do mesmo. A medição durava cerca de 30 segundos e após esse período, era oferecido um lanche leve ao voluntário.

3.2.2 Coleta de amostra de sangue

Inicialmente, era realizada a coleta de uma amostra de sangue venoso (aproximadamente 45 ml) por da punção da veia ante-cubital. Foram utilizados tubos a vácuo e o sangue foi colocado em tubo heparinizado para separação das células mononucleares, em tubo com gel para obtenção de soro para a dosagem da proteína C-reativa ultra-sensível, e em tubo com EDTA para dosagem da hemoglobina glicada e perfil lipídico.

3.2.2.1 Isolamento e congelamento de células mononucleares do sangue periférico

Foram separadas as células mononucleares de uma alíquota de aproximadamente 30 ml da amostra sanguínea coletada em tubo heparinizado. A separação foi realizada através da centrifugação em gradiente de densidade, através da técnica descrita por Boyum (1974) (96). As amostras foram diluídas 1:2 em tampão fosfato salina (PBS), aplicadas cuidadosamente sobre o gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e centrifugadas a 400g por 30 minutos a temperatura ambiente. As células presentes na interfase plasma-Ficoll Hypaque foram cuidadosamente coletadas e lavadas três vezes com PBS. A cada lavagem, a suspensão era centrifugada a 400g e temperatura de 3-4°C durante 12 minutos. As células mononucleares foram diluídas em solução de congelamento constituída de soro bovino fetal com 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e ressuspensas na concentração de 5×10^6 células/ml, aliqüotadas em tubos de congelamento de 2 ml e estocadas em freezer -80°C *overnight* e depois transferidas para tanque de nitrogênio líquido.

3.2.2.2 Determinação ultra-sensível da concentração plasmática de Proteína C-Reativa (PCR)

Uma alíquota do plasma, previamente separada após a coleta do sangue periférico em tubo com gel, foi utilizada para determinação de PCR por método imunoturbidimétrico em analisador ADVIA 1800 Chemistry System (Siemens, Tarrytown, NY, USA).

3.2.2.3 Determinação de Hemoglobina Glicada (HbA_{1c}) e concentrações plasmáticas de lipídios

A determinação da HbA_{1c} foi realizada por método de cromatografia líquida de alto desempenho e a concentração plasmática de Colesterol total e HDL, LDL e triglicérides foi

determinada por técnica de química úmida, ambos por meio do analisador ADVIA 1800 Chemistry System (Siemens, Tarrytown, NY, USA).

3.2.3 Teste de Função Pulmonar - Espirometria

Cerca de 30 minutos após o voluntário se alimentar era realizado o teste espirométrico. As provas de função pulmonar foram realizadas de acordo com as orientações das Diretrizes para Testes de Função Pulmonar (27), por meio de um módulo de fluxo acoplado a um sistema de medidas ventilatórias e metabólicas e o software Breeze 6.0 (ambos CPX-D, MedGraphics, St Paul, MN, EUA). Nestas provas foram realizadas as manobras de capacidade vital lenta (CVL), capacidade vital forçada (CVF) e ventilação voluntária máxima (VVM). Cada manobra foi realizada até serem obtidas três curvas aceitáveis e duas reproduzíveis, não excedendo mais que oito tentativas (27).

O voluntário permanecia na posição sentada, com a cabeça em posição neutra e utilizando um clipe nasal para evitar vazamento de ar pelas narinas (figura 1). Ele repousava por 10 minutos antes do teste e o procedimento era cuidadosamente descrito para evitar vazamentos em torno da peça bucal.

A partir das provas espirométricas, foram obtidos valores absolutos e em porcentagem do previsto para cada grupo, referentes a CVL, CVF, VVM, capacidade inspiratória (CI), volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF_1), fluxo expiratório forçado 25-75% ($FEF_{25-75\%}$), pico de fluxo expiratório ($FEF_{m\acute{a}x}$).

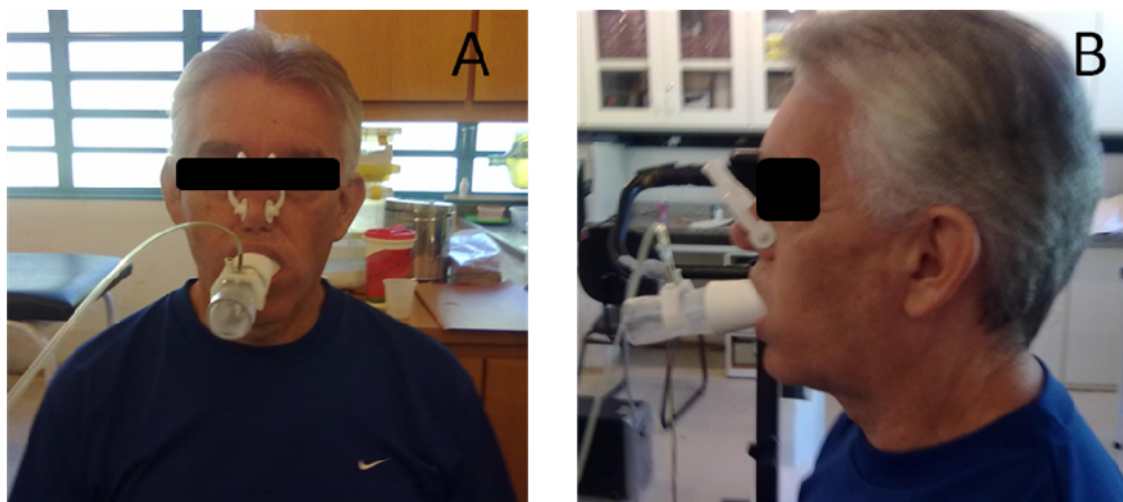


Figura 1. Procedimento experimental: voluntário durante o teste de função pulmonar. (A) Vista frontal; (B) Vista lateral.

3.2.4 Teste Cardiopulmonar

Foi aplicado um teste de esforço físico dinâmico contínuo, protocolo do tipo rampa (figura 2). Esse teste tem como objetivo avaliar a capacidade e potência aeróbias dos voluntários por meio das respostas da frequência cardíaca e variáveis ventilatórias e metabólicas no momento do limiar de anaerobiose ventilatório (LA) e no pico do esforço.

As variáveis ventilatórias e metabólicas foram obtidas por um sistema computadorizado de análise ergoespirométrica CPX/D da marca MedGraphics (St. Paul, Minnessota, EUA), utilizando o *software BreezeEX* para a captação, armazenamento e processamento por meio de um conversor analógico-digital das variáveis cardiorrespiratórias e metabólicas. Esse *software* também possibilita o registro gráfico das variáveis respiratórias em função do tempo ou em função do VO_2 , (*V-slope*).

Os dispositivos e componentes utilizados para a coleta das variáveis ventilatórias foram a *sampleline* acoplada ao pneumotacógrafo de Pitot conectado ao sistema CPX/D e essa peça

encaixada na máscara da Medgraphics que permite que o voluntário respire de maneira nasal ou bucal.

O teste cardiopulmonar era iniciado com a preparação do voluntário por limpeza e abrasão da pele com álcool e algodão para adequada colocação dos eletrodos de registro do eletrocardiograma.

O voluntário deveria estar relaxado e em repouso na posição sentada para adaptação das variáveis cardiovasculares (pressão arterial e frequência cardíaca), ventilatórias e metabólicas às condições ambientais para a realização do teste.

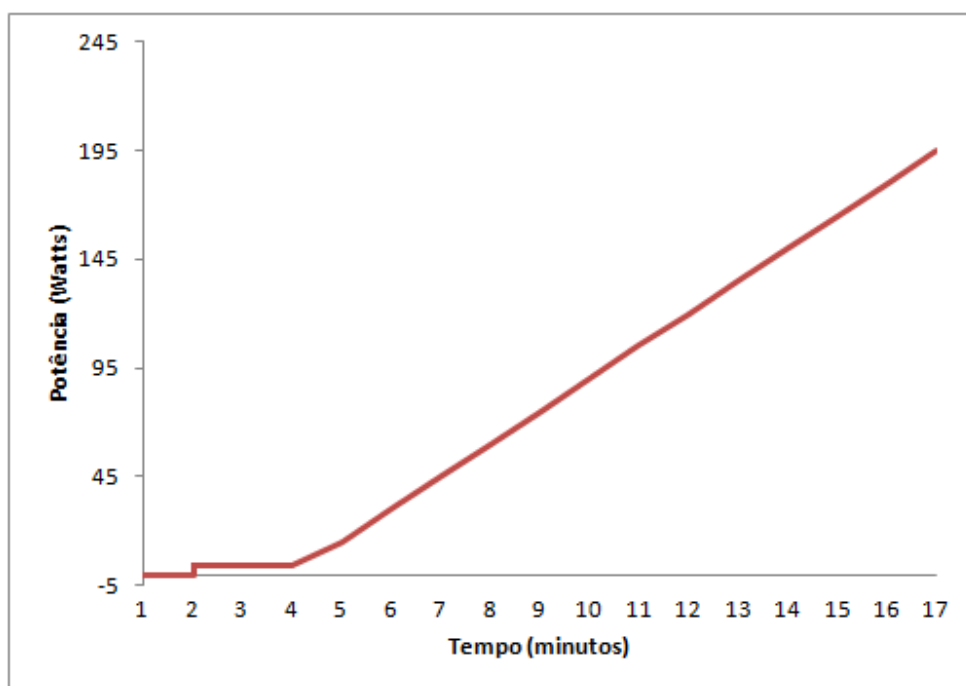


Figura 2. Representação esquemática do teste de exercício físico dinâmico contínuo do tipo rampa. O voluntário permanecia 1 minuto em repouso, 3 minutos em carga inicial de 4 Watts e em seguida exercício progressivo com incremento de 13-22 Watts de potência, até a potência máxima suportada pelo voluntário.

Os testes foram realizados em bicicleta ergométrica de frenagem eletromagnética (Quinton Corival 400, Seattle, WA, USA). Os voluntários foram orientados a manterem a cadência em 60 rotações por minuto (rpm) e não realizar contrações isométricas com os membros superiores ao segurar o guidão durante a execução dos teste de exercício. O protocolo contínuo do tipo rampa iniciava com 1 min de repouso com o voluntário devidamente posicionado sobre a bicicleta ergométrica. Em seguida, havia um período de aquecimento com potência de 4W por 3 minutos e posterior incremento de potência (figura 2), que variava de 13-22W/min, baseado na fórmula proposta por Wasserman (24):

$$\text{Incremento de potência (W)} = [\text{altura} - (\text{idade} \times 20)] - [150 + (6 \times \text{peso corporal})]/100.$$

As unidades para as variáveis são: altura em centímetros, idade em anos e peso corporal em quilos.

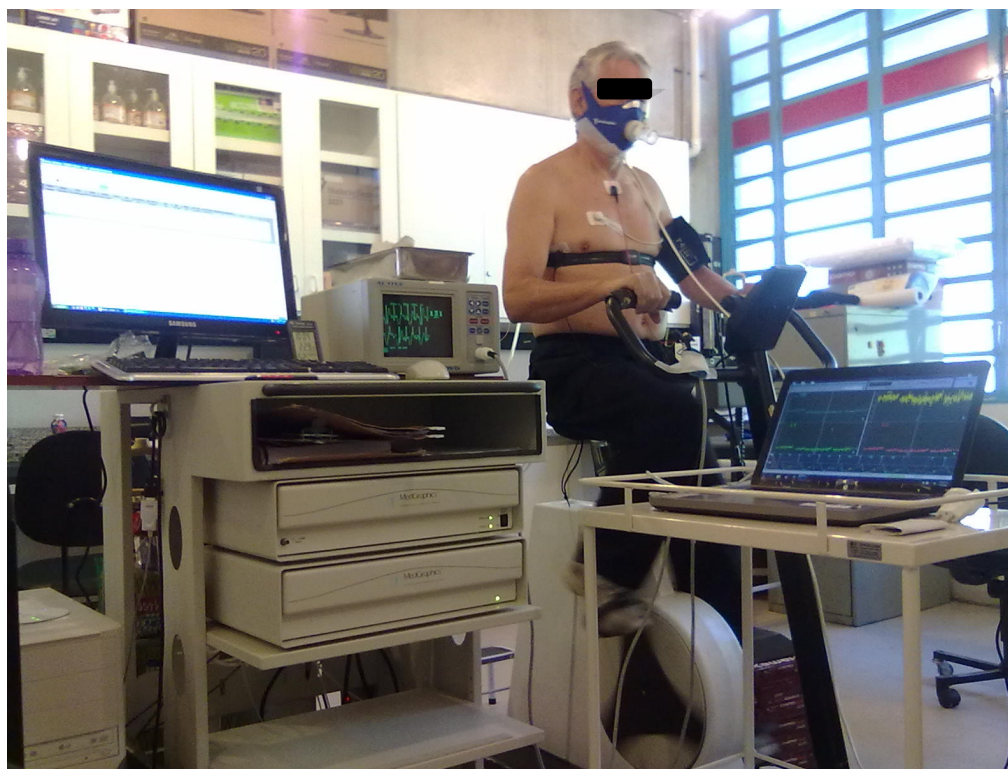


Figura 3. Procedimento experimental: voluntário durante o teste de exercício cardiopulmonar em cicloergômetro

Durante o teste de esforço físico, a cada 2 minutos, a pressão arterial era verificada por método auscultatório e o voluntário era perguntado a respeito do cansaço nos membros inferiores, dispnéia e dor no peito, escolhendo uma nota para cada um desses itens de acordo com a Escala de Borg (CR10). Além disso, os voluntários eram monitorizados continuamente na derivação eletrocardiográfica MC5 modificada (figura 3). Os eletrodos eram posicionados da seguinte maneira:

- MC5: eletrodo negativo (vermelho) posicionado no ápice do manúbrio esternal, eletrodo positivo (amarelo) no quinto espaço intercostal na direção da linha axilar anterior da esquerda (correspondente a V5) e o eletrodo neutro (preto) posicionado no quinto espaço intercostal direito.

O teste cardiopulmonar aplicado no presente estudo foi sintoma-limitado (97). A interrupção do teste ocorreu quando o voluntário atingiu pressão sistólica igual ou superior a 200 mmHg ou pressão diastólica igual ou superior a 120 mmHg, quando o voluntário não conseguia manter a cadência de 60 rpm ou se referisse dor torácica e/ou exaustão respiratória e muscular pela escala de Borg (CR10). Para aceitar a eficácia do teste, a duração da fase de incremento de carga deveria ser entre 8 a 12 minutos e a taxa de troca gasosa (RER) deveria ser igual ou superior a 1,0.

Os voluntários eram orientados a não conversar com os pesquisadores, porém informar, imediatamente, por meio de comandos previamente combinados, sinais e sintomas que poderiam surgir como tontura, turvação visual, náuseas, dor, cansaço, fadiga, dor em membros inferiores ou qualquer alteração no seu estado geral que pudesse impossibilitar a continuidade dos testes.

No sistema CPX/D, a análise de O₂ é realizada por meio de um eletrodo de zircônio e de CO₂ através de um sensor infravermelho que fornece, em tempo real, os valores de potência da

bicicleta ergométrica, a frequência cardíaca (FC) e os valores do consumo de O_2 (VO_2 ml/kg/min), a produção de CO_2 (VCO_2 l/min) e a ventilação pulmonar (VE l/min) coletados respiração a respiração ou representado por médias móveis de 8 ciclos respiratórios. Os dados também são calculados e armazenados em tabelas e em gráficos com os valores dos equivalentes ventilatórios do O_2 (VE/VO_2) e do CO_2 (VE/VCO_2), as pressões parciais ao final da expiração do O_2 (PET_{O_2}) e do CO_2 (PET_{CO_2}), a taxa de troca gasosa (RER) (VCO_2/VO_2), o volume corrente (VC) e a frequência respiratória. Todas essas variáveis foram tabuladas, analisadas e incluídas no presente estudo.

Após os testes, a primeira medida examinada foi o consumo de oxigênio pico, com objetivo de estabelecer se as respostas fisiológicas atingiram a potência aeróbia de pico. Para classificação aeróbia funcional dos indivíduos, foi utilizado o maior valor do consumo de oxigênio encontrado no pico do exercício (91).

A análise dos gráficos e determinação do LA foi realizada de maneira independente por três pesquisadores familiarizados com a utilização do sistema ergoespirométrico CPX-D MedGraphics. A análise dos gráficos foi realizada em monitor colorido de 15 polegadas (Samsung SyncMaster 550V) de um microcomputador acoplado ao sistema CPX-D. Para garantir o controle qualitativo do experimento foi observado graficamente: a) se a velocidade de cadência da bicicleta ergométrica foi constante; b) se houve artefatos que prejudicassem a determinação do LA; c) se o voluntário atingiu o estado de equilíbrio na fase de aquecimento; d) se o início da resposta da frequência cardíaca e variáveis ventilatórias coincidiram com o início da rampa; e) se as variáveis ventilatórias mostram comportamento linear no início da rampa.

A partir dessa análise, o observador concluía se a qualidade do teste foi satisfatória para o prosseguimento na determinação do LA a partir do método de análise visual gráfica das variáveis

ventilatórias. A análise qualitativa, fundamentada nas recomendações de Wasserman (24), foi iniciada a partir da seleção do trecho a ser analisado, feita por 3 observadores independentes.

A determinação do LA utilizando o método de análise visual gráfica das variáveis ventilatórias foi realizada selecionando no teste de exercício o período correspondente ao momento em que são observadas a elevação das variáveis ventilatórias. Foi observado no trecho selecionado das curvas de oxigênio e produção de gás carbônico plotadas em médias móveis a cada 8 ciclos respiratórios em função do tempo: a) o momento em que a VCO_2 aumenta desproporcionalmente em relação ao VO_2 (24), ou seja, quando ocorre perda de paralelismo entre as respostas das duas variáveis; b) as respostas da relação VE/VO_2 , c) do RER (VCO_2/VO_2) e d) do comportamento da $PETO_2$ em relação ao tempo de esforço físico dos voluntários.

Os valores encontrados pelos 3 observadores eram confrontados e caso houvesse concordância entre eles, o LA era aceito. Caso não fossem concordantes, mas a variação fosse igual ou inferior a 30 segundos nos tempos encontrados, eram feitas as médias desses valores. Se o intervalo de tempo fosse superior a 30 segundos, um quarto observador era chamado para compor o grupo e fazer a análise.

3.2.5 Detecção de citocinas intracelulares em linfócitos T

3.2.5.1 Descongelamento das células mononucleares

Após o descongelamento da suspensão de células mononucleares em banho-maria, a mesma foi transferida para um falcon de 15 ml contendo RPMI 1640 com 20% de soro bovino fetal. Essa suspensão foi centrifugada e o sobrenadante desprezado. As células foram lavadas mais duas vezes em solução com RPMI 1640 e 20% de soro bovino fetal. A viabilidade das células mononucleares foi avaliada utilizando-se Azul de Trypan a 2%. As células foram

ressuspendidas em RPMI 1640 com 10% de soro bovino fetal e concentrações finais de $2,0 \times 10^6$ células/ml e incubadas por 2 horas em falcons de 15 ml a meia rosca a temperatura de 37°C, em ambiente úmido e com CO₂ à concentração aproximada de 5%.

3.2.5.2 Quantificação por citometria de fluxo

A produção de citocinas por linfócitos T foi detectada por citometria de fluxo, realizando-se marcação intracelular das citocinas produzidas pelos linfócitos após ativação com estímulo policlonal (98).

Após a incubação da suspensão de células, a amostra era dividida em 3 tubos falcon de 15ml. As células eram estimuladas com 25ug/ml de PMA (forbol-miristato-acetato; Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e 1ug/ml de Ionomicina (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha), na presença ou não de 10 ug/ml de Brefeldina A (Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂, por 6 horas.

Eram preparados três tipos de amostras: 1, controle não-estimulado (células + Brefeldina A), usado para determinar o nível de síntese residual de citocinas devido à ativação *in vivo*; 2, amostra estimulada (células + Brefeldina A+ PMA + Ionomicina); 3, controle da ativação (células + PMA + Ionomicina) usada para determinar o nível de ativação celular por meio da expressão do marcados de ativação precoce CD69.

Após a incubação de 6 horas com os estímulos, as células eram incubadas com 100 ul/ml de EDTA estéril a 20mM por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida as células eram transferidas para tubo de citometria (12 X 75 mm) e marcadas com o anticorpo monoclonal específico contra antígenos de superfície (CD3 ou CD3/CD69) ou isotipos controles. Os tubos eram homogenizados e incubados por 20 minutos a 4°C, no escuro. Os anticorpos são diretamente conjugados a fluorocromos, e foram adquiridos da BD Biosciences (San Diego, CA,

USA). Após a incubação, a suspensão foi lavada com PBS e submetida a lise e permeabilização de acordo com o protocolo do fabricante.

Para lise celular, era adicionado às células 1 ml da solução de lise (*FACs lysing solution*, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, no escuro, as células eram centrifugadas por 5 minutos a 500g e o sobrenadante desprezado. Ao *pellet* eram adicionados 300 uL de solução de permeabilização (*FACS permeabilizing solution*, BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Novamente, as células eram incubadas por dez minutos em temperatura ambiente e no escuro, e em seguida, eram adicionados 2 ml de tampão de lavagem (PBS) e centrifugados por 5 minutos a 500g.

Após fixação e permeabilização, o sobrenadante era desprezado e adicionava-se 3uL/tubo dos anticorpos monoclonais anti- IFN- γ , Anti- TNF- α , Anti-IL-4, Anti-IL-10 e Anti-IL-17 ou isotipos controles intracelulares adquiridos da BD Biosciences (San Diego, CA, USA). As células eram incubadas em temperatura ambiente por 30 minutos, sob proteção da luz. Após este período as células eram lavadas com PBS e o sobrenadante novamente desprezado. Por fim era adicionados 200 uL de PBS acrescido de paraformaldeído (PFA) 1%.

A leitura das células marcadas era realizada no Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Ribeirão Preto em citômetro FACSort (BD Bioscience, San Diego, CA, USA) em até 24 horas após o procedimento de marcação e as células eram mantidas no escuro a 4 °C durante esse período.

Durante a aquisição das células, foi desenhada uma *gate* na população de linfócitos, estabelecida com base nos parâmetros de tamanho e granularidade (apêndice B). As análises em dot-plot foram realizadas pelo programa Cellquest (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Em ambas as amostras (estimulada e não estimulada) a marcação inespecífica observada através do

isotipo controle foi descontada. Os resultados das análises foram expressos em porcentagem de células duplo-positivas.

3.3 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o software MINITAB versão 15.0. Foram utilizados o teste Anderson-Darling e o teste de Levene para verificar o padrão de normalidade da distribuição e igualdade de variância dos dados, respectivamente. A partir do padrão dos dados, foram utilizados testes paramétricos (teste t de Student) ou não-paramétricos (teste de Mann-Whitney). Foi utilizado o testes de correlação de Pearson para verificar a relação entre as variáveis estudadas no grupo diabético. Foi utilizado teste de regressão logística, quando apropriado, para indicar quais variáveis estão mais relacionadas à probabilidade de ser portador de DM e estimar essa chance. A regressão logística é uma técnica estatística que tem como objetivo produzir, a partir de um conjunto de variáveis, um modelo que permita a predição de um determinado evento ocorrer ou não. O critério de escolha das preditoras para compor as regressões logísticas foi considerar, dentre todas as variáveis de cada grupo, aquelas que não fossem, pelo menos, moderadamente correlacionadas. A partir disso, foi realizado o refinamento dessas variáveis pela técnica *step wise*, para chegar no modelo de predição mais adequado. A adequabilidade do modelo foi verificada utilizando os seguintes testes estatísticos: Pearson, Deviance e Hosmer-Lemeshow. Em todas as análises foi considerado nível de significância 0,05.

4.RESULTADOS

Participaram do estudo 38 voluntários de 227 avaliados para elegibilidade. Dentre os incluídos no estudo, 19 voluntários eram diabéticos e 19 saudáveis. A figura 1 apresenta o fluxograma de exclusões, sendo que o principal motivo, para ambos os grupos, foi histórico de tabagismo.

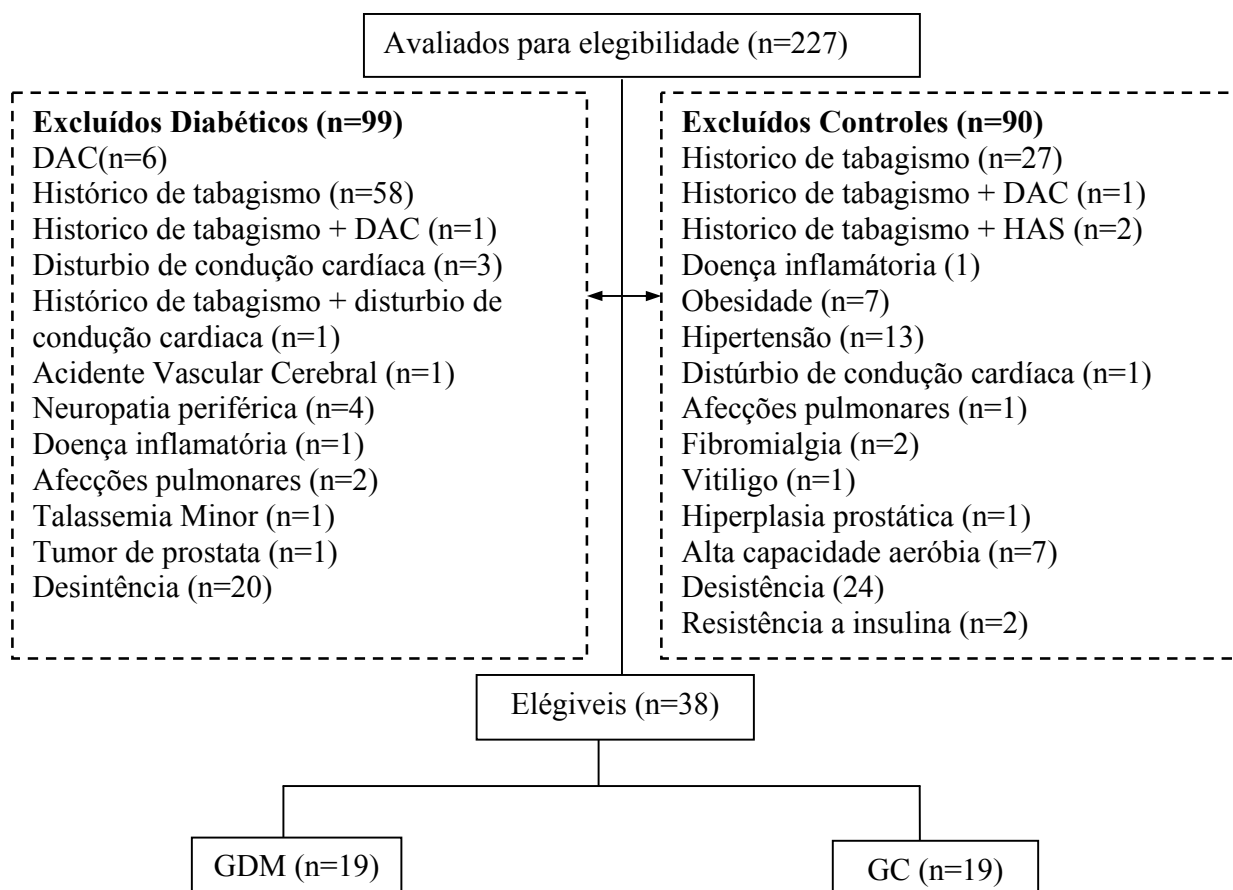


Figura 4. Diagrama demonstrativo da composição da amostra.

DAC – Doença Arterial Coronariana; GDM – Grupo diabético, GC – Grupo Controle;

A tabela 1 apresenta os dados referentes as características clínicas e laboratoriais dos voluntários estudados. Os grupos apresentaram idades, concentração plasmática de lipídios, porcentagem de gordura e concentrações de PCR similares e diferenças em relação a massa

corporal, IMC e HbA_{1c}. Em relação ao uso de medicamentos, a maioria dos indivíduos do grupo diabético faziam uso de hipoglicemiante oral para controle glicêmico (74%), sendo que alguns desses associavam esse medicamento à insulina e quatro diabéticos utilizavam somente a insulina para controle da glicemia.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos grupos estudados

| | GC | GDM | P |
|---|--------------|--------------|---------------------|
| n | 19 | 19 | - |
| Idade (anos) | 48,8 ± 7,5 | 51,2 ± 5,9 | 0,16 |
| Massa Corporal (Kg) | 76,6 ± 8,9 | 85,5 ± 13,7 | 0,02 ^a |
| IMC (kg/m ²) | 25,9 ± 0,9 | 29,5 ± 5,4 | <0,01 ^a |
| Porcentagem de gordura (%) | 22,8 ± 3,3 | 25,4 ± 6,4 | 0,15 |
| Duração do Diabetes (anos) | - | 11 ± 1,5 | - |
| FC de repouso (batimentos/min) | 71,3 ± 9,0 | 78,3 ± 9,8 | 0,03 ^a |
| PAS de repouso (mmHg) | 130 ± 20 | 120 ± 20 | 0,48 |
| PAD de repouso (mmHg) | 80 ± 10 | 80 ± 10 | 0,81 |
| HbA _{1c} (%) | 5,8 ± 0,5 | 8,8 ± 1,9 | <0,001 ^a |
| Colesterol total (mg/dl) | 192 ± 75 | 181 ± 40 | 0,25 |
| HDL colesterol (mg/dl) | 48,0 ± 10,6 | 45,6 ± 11,6 | 0,52 |
| LDL colesterol (mg/dl) | 121,6 ± 35,6 | 113,8 ± 30,7 | 0,49 |
| Triglicérides (mg/dl) | 138 ± 132 | 140 ± 143 | 0,83 |
| PCR (mg/L) | 0,5 ± 0,7 | 0,4 ± 1,8 | 0,76 |
| Medicamentos | | | |
| Insulina | - | 9 (47%) | - |
| Hipoglicemiante oral (metformina, glibenclamida, janumet) | - | 14 (74%) | - |
| Antihipertensivo (captopril, diovan, losartana) | - | 4 (21%) | - |
| hipocolesterolêmico (ciprofibrato, sinvastatina) | 3 (16%) | 6 (32%) | - |
| Benzodiazepínicos | - | 1 (5%) | - |
| Omeprazol | - | 1 (5%) | - |

Os dados estão apresentados em médias e desvio padrão ou medianas e intervalos interquartis. GC, grupo controle; GDM, grupo diabético, IMC, índice de massa corpórea; FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica. ^a p<0,05; ^b p<0,001. Nível de significância de 5%.

Tabela 2 – Teste de função pulmonar

| | GC | GDM | P |
|-----------------------------------|---------------------|---------------------|-------------|
| CVL (L) | 4,6 ± 0,6 | 4,4 ± 0,9 | 0,59 |
| CVL (% predito) | 100,6 ± 12,5 | 99,5 ± 14,1 | 0,80 |
| CI (L) | 3,4 ± 0,6 | 3,6 ± 0,7 | 0,39 |
| CI (% predito) | 96,0 ± 13,9 | 102,1 ± 15,7 | 0,22 |
| VRE (L) | 1,1 ± 0,4 | 2 ± 0,4 | 0,08 |
| VRE (% predito) | 132,3 ± 48,8 | 110,3 ± 54,2 | 0,20 |
| CVF (L) | 4,6 ± 0,7 | 4,6 ± 0,8 | 0,82 |
| CVF (% predito) | 101,5 ± 9,1 | 104 ± 13,1 | 0,51 |
| VEF ₁ (L) | 3,6 ± 0,5 | 3,7 ± 0,6 | 0,58 |
| VEF ₁ (% predito) | 99,8 ± 11,1 | 104,6 ± 13,0 | 0,23 |
| VEF ₁ /CVF | 80,6 ± 1,4 | 80,1 ± 1,3 | 0,20 |
| FEF _{25-75%} (L/min) | 3,6 ± 1 | 4,0 ± 1 | 0,18 |
| FEF _{25-75%} (% predito) | 101,1 ± 28,9 | 116,1 ± 25,2 | 0,10 |
| FEF _{máx} (L/min) | 8,8 ± 2,2 | 8,2 ± 1,6 | 0,36 |
| FEF _{máx} (% predito) | 95,2 ± 21,8 | 90,4 ± 15,4 | 0,44 |
| VVM (L) | 173,1 ± 32,6 | 160,8 ± 30,7 | 0,24 |
| VVM (% predito) | 113,6 ± 18,7 | 107,2 ± 14,4 | 0,25 |

Os dados estão apresentados em médias e desvio padrão ou medianas e intervalos interquartis. GC, grupo controle; GDM, grupo diabético; CVL, capacidade vital lenta; CI, capacidade inspiratória; VRE, volume de reserva expiratório; CVF, capacidade vital forçada; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado 25-75%; FEF_{máx}, pico de fluxo expiratório; VVM, ventilação voluntária máxima. Nível de significância de 5%.

A análise dos dados dos testes de função pulmonar (tabela 2), não mostram diferença entre os grupos. Por outro lado, embora não fosse objetivo inicial do estudo, o modelo de regressão logística revelou que o FEF_{25-75%} em valores absolutos, o VEF₁/CVF e a razão entre o valor absoluto e o predito da VVM (RVVM) (tabela 3) foram influentes na predição do DM. Para a variável FEF_{25-75%}, seu aumento, considerando as demais variáveis espirométricas constantes, representou uma maior chance de ser diabético. Já o VEF₁/CVF e o RVVM apresentaram um comportamento inverso, em que quanto menor seus valores, maior a probabilidade de ser diabético. O VC em valores absolutos, embora tenha sido incluído no modelo de regressão, apresentou efeito mínimo em relação à previsão do DM. A habilidade

preditiva de DM do modelo com as variáveis espirométricas foi de 81.9%. Não foram observadas correlações entre as variáveis espirométricas e o PCR ou HbA_{1c}.

Tabela 3. Modelo de predição de DM a partir das variáveis espirométricas

| Preditor | Coeficiente estimado | P | OR (estimado) | IC | |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------------|---------------|-------------|---------------|
| | | | | LI | LS |
| Constante calculada | 82,8455 | 0,024^a | - | - | - |
| VC (L/min) | 1,9734 | 0,193 | 7,20 | 0,37 | 140,81 |
| VEF ₁ /CVF (razão das %) | -1,1542 | 0,022^a | 0,36 | 0,15 | 0,86 |
| FEF _{25-75%} (L/min) | 1,1542 | 0,036^a | 3,17 | 1,08 | 9,33 |
| RVVM | -9,9946 | 0,014^a | 0,00 | 0,00 | 0,13 |

OR, odds ratio; IC, Intervalo de confiança; LI, limite inferior; LS, limite superior; VEF₁, volume expiratório forçado no primeiro segundo; CVF, capacidade vital forçada; FEF_{25-75%}, fluxo expiratório forçado 25-75%; RVVM, razão entre ventilação voluntária máxima absoluta sobre a predita. ^a p<0,05. Nível de significância de 5%.

A tabela 4 apresenta os principais dados obtidos no teste de exercício cardiopulmonar. Os valores de potência máxima obtida, frequência cardíaca pico, VO₂ no LA e VO_{2pico} foram significativamente menores no grupo diabético. O VE/VO₂ e VE/VCO₂ no LA e taxa de troca gasosa (RER) no pico do exercício foram significativamente superiores nos diabéticos. A potência ajustada pelo peso foi superior no grupo controle tanto no LA quanto no pico do exercício.

Observamos que os principais motivos de interrupção do teste de exercício foram a elevação da pressão arterial sistólica e fadiga muscular. Não foram observadas correlações entre as variáveis do teste de exercício e as concentrações plasmáticas de PCR ou HbA_{1c}.

Tabela 4. Parâmetros do teste de exercício cardiopulmonar

| | GC | GDM | p | GC | GDM | P |
|--|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|
| | LA | | | Pico | | |
| Potência (W) | 82,5 ± 19,8 | 72,2 ± 17,8 | 0,24 | 158,3 ± 22,3 | 135,1 ± 25,2 | 0,006^a |
| Potência (W)/ Peso (Kg) | 1,1 ± 0,3 | 0,9 ± 0,2 | 0,02^a | 2,1 ± 0,3 | 1,6 ± 0,2 | <0,001^b |
| FC (bpm) | 102,5 ± 14,1 | 104,9 ± 10,5 | 0,55 | 148,9 ± 12,24 | 138,6 ± 10,26 | 0,009^a |
| PAS (mmHg) | 155 ± 16,8 | 162 ± 16,7 | 0,20 | 183 ± 13,8 | 186 ± 17,7 | 0,57 |
| PAD (mmHg) | 90 ± 20 | 90 ± 10 | 0,17 | 100 ± 20 | 100 ± 20 | 0,90 |
| Duplo Produto (mmHg X bpm) | 16057 ± 3670 | 17003 ± 2248 | 0,35 | 27268 ± 3104 | 25752 ± 2781 | 0,13 |
| RER | 0,9 ± 0,1 | 0,9 ± 0,1 | 0,20 | 1,0 ± 0,2 | 1,1 ± 0,2 | 0,04^a |
| VO ₂ (ml/kg/min) | 14,1 ± 3,4 | 12,2 ± 2,2 | 0,04^a | 24,2 ± 3,2 | 18,9 ± 2,8 | <0,001^b |
| VCO ₂ (ml/min) | 931,9 ± 194,1 | 924,8 ± 162,2 | 0,90 | 1972,1 ± 260 | 1852,7 ± 330 | 0,30 |
| VE (L/min) | 25,9 ± 5,7 | 26,8 ± 4,9 | 0,6 | 57,6 ± 11,8 | 55,7 ± 12,6 | 0,64 |
| Pulso de O ₂ (ml/batimento) | 10,4 ± 2,1 | 9,8 ± 1,5 | 0,29 | 12,3 ± 2,1 | 11,8 ± 2,3 | 0,43 |
| VE/VO ₂ | 24 ± 4 | 26 ± 4 | 0,03^a | 31,4 ± 5,1 | 34,3 ± 5,6 | 0,10 |
| VE/VCO ₂ | 28 ± 3 | 29 ± 3 | <0,001^b | 28,9 ± 4,4 | 29,8 ± 3,13 | 0,46 |
| PETCO ₂ (mmHg) | 88 ± 4,4 | 90 ± 3,5 | 0,12 | 96,7 ± 5,9 | 99,1 ± 5,2 | 0,21 |
| PETCO ₂ (mmHg) | 41,3 ± 3,7 | 40 ± 2,9 | 0,25 | 39,6 ± 5,3 | 38,2 ± 3,8 | 0,34 |
| ΔVO ₂ (ml/min)/ ΔPotência (W) | 9,3 ± 1,4 | 9,7 ± 1,6 | 0,45 | 10,2 ± 1,4 | 9,8 ± 1,6 | 0,54 |

Os dados estão apresentados em médias e desvio padrão ou medianas e intervalos interquartis. GC, grupo controle; GDM, grupo diabético; LA, limiar de anaerobiose; FC, frequência cardíaca; PAS, pressão arterial sistólica; PAD, pressão arterial diastólica; RER, taxa de troca gasosa; VO₂, consumo de oxigênio; VCO₂, liberação de gás carbônico; VE, ventilação pulmonar. ^a p<0,05; ^b p<0,001. Nível de significância de 5%.

Em relação ao modelo de regressão logística das variáveis do teste de exercício cardiopulmonar (tabela 5), observamos que a potência pico, frequência cardíaca pico e VCO₂ pico são variáveis influentes na predição do DM, ao contrário da frequência cardíaca no LA que não foi considerada significativa no modelo. Para as variáveis de potência pico e frequência cardíaca pico, valores menores representam maior probabilidade de ser diabético. Por outro lado, o VCO₂ apresentou comportamento inverso, ou seja, quanto maior seu valor, maior a probabilidade de ser diabético. A habilidade preditiva deste modelo foi de 90,9%.

Tabela 5. Modelo de predição de DM a partir das variáveis do teste de exercício cardiopulmonar

| Preditor | Coeficiente estimado | P | OR (estimado) | IC | |
|--------------------------------|----------------------|--------------------------|---------------|-------------|-------------|
| | | | | LI | LS |
| Constante | 12,8845 | 0,069 | - | - | - |
| Potência pico (W) | -0,1226 | 0,008^a | 0,88 | 0,81 | 0,97 |
| FC pico (batimentos/min) | -0,1370 | 0,017^a | 0,87 | 0,78 | 0,98 |
| FC no LA (batimentos/min) | 0,987 | 0,055 | 1,10 | 1,00 | 1,22 |
| VCO ₂ pico (ml/min) | 0,0076 | 0,028^a | 1,01 | 1,00 | 1,01 |

OR, odds ratio; IC, intervalo de confiança; LI, limite inferior; LS, limite superior; FC, frequência cardíaca; VCO₂, liberação de gás carbônico. ^a p<0,05. Nível de significância de 5%.

A tabela 6 apresenta os resultados da expressão de citocinas nos linfócitos T. A porcentagem de ativação das células recomendada, verificada através da expressão do CD69, deve ser superior a 90% (99). Em nossas amostras, os valores da porcentagem de ativação celular foi baixo em ambos os grupos (29,64 ± 7,8 no grupo controle e 32,32 ± 11,33 no grupo diabético), sendo estatisticamente semelhantes (p=0,54). Houve perdas de amostras de células durante a ativação após o descongelamento, pois em algumas amostras a quantidade de células viáveis era muito pequena inviabilizando a análise por citometria. Ao final dos experimentos foi possível quantificar a expressão de citocinas em linfócitos T de 9 indivíduos do grupo DM e 15

do grupo controle. Não foram observadas diferenças entre os grupos para os dados perfil intracelular de produção de citocinas linfocitárias do sangue periférico.

Tabela 6. Porcentagem de expressão de citocinas nos linfócitos T

| | GC | GDM | P | GC | GDM | P |
|---------------|----------------------|---------------------------------------|-------------|---------------------------------------|-------------------------|-------------|
| | Basal | | | Amostra estimulada | | |
| TNF- α | 0,1 (0,0-2,0) | 0,2 \pm (0,0-1,0) | 0,90 | 33,4 (24,2-59,6) | 40,1 (31,0-52,6) | 0,11 |
| IFN- γ | 0,4 (0-2,44) | 0,6 (0,11-2,28) | 0,23 | 16,7 (8,9-40,4) | 15,5 (0,0-32,3) | 0,51 |
| IL-4 | 2,2 (0,0-5,4) | 3,0 \pm (1,1-5,3) | 0,18 | 3,3 (1,0-10,1) | 4,3 (0,9-15,1) | 0,23 |
| IL-10 | 0,0 (0,0-0,8) | 0,3 (0,0-1,2) | 0,22 | 0,3 \pm (0,0-1,5) | 0,5 (0,0-3,2) | 0,42 |
| IL-17 | 0,2 (0,0-1,0) | 0,3 (0,0-2,2) | 0,33 | 0,4 (0,0-4,1) | 0,9 (0,0-5,2) | 0,58 |

Os dados estão apresentados em médias ou medianas e valores mínimo e máximo. GC, grupo controle; GDM, grupo diabético. Nível de significância de 5%.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos indicam que em indivíduos portadores de DM há menor capacidade cardiopulmonar do que em indivíduos controles. Esta menor capacidade não está correlacionada as concentrações plasmáticas de HbA_{1c} ou PCR. Não foram encontradas diferenças nas variáveis de função pulmonar, porém a VEF₁/CVF em porcentagem do predito, FEF_{25-75%} e RVVM e também as variáveis do teste de exercício, potência pico, FC pico e VCO₂ foram preditoras do diabetes mellitus. Não houve diferenças nas concentrações plasmáticas de PCR e lipídios e na expressão de citocinas linfocitárias entre os grupos DM e controle.

A redução da capacidade cardiopulmonar em diabéticos tem sido descrita em diversos estudos. Nossos resultados corroboram em estudos prévios que mostraram redução do VO_{2pico} e do VO_{2LA} (3; 18; 33; 52; 100-102) e maiores valores de taxa de troca gasosa (RER) em indivíduos diabéticos devido ao aumento do metabolismo anaeróbio e redução da capacidade oxidativa do músculo esquelético (33; 103). O VO_{2pico} é a medida que melhor representa o desempenho físico. Sua redução em indivíduos portadores de DM não parece ser devido ao sedentarismo ou obesidade (3), comumente representando alterações sub-clínicas micro e macrovasculares (19).

Nesse estudo os indivíduos diabéticos apresentaram maiores valores dos equivalentes ventilatórios de oxigênio e gás carbônico (VE/VO₂ e VE/VCO₂) no limiar de anaerobiose. Ambos equivalentes, no momento do LA podem ser utilizados como indicador de eficiência ventilatória, demonstrando o grau de adequação da resposta ventilatória aos estímulos metabólicos, embora o VCO₂ seja mais comumente utilizado (25). Maiores valores indicam a necessidade de maior ventilação para conseguir manter os níveis requeridos de oxigênio e eliminação de gás carbônico, demonstrando que diabéticos possuem menor eficiência ventilatória. No modelo de predição de diabetes utilizando as variáveis do teste de exercício, observamos que quanto maior o valor do VCO₂ no LA, considerando as demais variáveis

constantes, maior a probabilidade de possuir diabetes, indicando a associação entre diabetes e redução da eficiência ventilatória.

Alterações na extração periférica de oxigênio em indivíduos portadores de DM foram observadas por Baldi e colaboradores (33). A piora da capacidade de difusão está intimamente associada a alterações vasculares, influenciando a relação ventilação-perfusão e, conseqüentemente, reduzindo a eficiência ventilatória (104).

Seyoum e colaboradores (19) e Benbassat e colaboradores (52) avaliaram a resposta de diabéticos ao teste de exercício físico, obtendo resultados semelhantes aos do presente estudo, com importantes diferenças no $VO_{2\text{pico}}$. O primeiro estudo (19) incluiu somente o teste de exercício cardiopulmonar e concluiu que a redução do $VO_{2\text{pico}}$ comumente representa alterações sub-clínicas micro e macro-vasculares, o que pode sinalizar futuros eventos clínicos cardiovasculares. Benbassat e colaboradores (52), adicionou a avaliação da capacidade de difusão, concluindo que as alterações na condicionamento cardiopulmonar seria devido a fatores cardiovasculares que ocasionaria mudanças microvasculares no sistema pulmonar alterando negativamente o desempenho no exercício físico.

Corroborando também, Middlebrooke e colaboradores (105) utilizaram o teste de exercício cardiopulmonar e laser doppler no antebraço para avaliar a função microvascular, verificando que o condicionamento cardiopulmonar tinha correlação com disfunção microvascular em indivíduos com resistência à insulina. Por outro lado, a capacidade aeróbia não estava reduzida nesses indivíduos quando comparados aos controles, indicando que as alterações vasculares ocorrem antes das alterações cardiopulmonares e precedem o desenvolvimento do DM. As complicações vasculares resultam em alterações na capacidade de desempenho no exercício e ambas podem eventualmente sinalizar futuros eventos clínicos cardiovasculares no DM (19). Adicionalmente, as alterações do metabolismo lipídico presentes no DM afetam a

eficiência de extração do oxigênio (24). Embora nosso estudo não tenha avaliado a capacidade de difusão, diversos autores tem demonstrado em indivíduos portadores de DM associação de sua redução com alterações micro e macro-vasculares e com a limitação da capacidade cardiopulmonar.

A hiperglicemia é um fator que tem sido associado com disfunção endotelial, micro e macroangiopatia e piora na capacidade de difusão, fatores estes que afetam a regulação do transporte de oxigênio e sua utilização (15; 20). Por outro lado, o impacto do controle glicêmico no $VO_{2\text{pico}}$ e na capacidade de exercício em diabéticos apresentam dados conflitantes (15; 18; 20). Nossos resultados estão de acordo com outros estudos (18; 106; 107) que não observaram nenhuma correlação significativa entre controle glicêmico e capacidade de exercício em adultos com DM.

No presente estudo, os diabéticos alcançaram menor potência no pico do exercício assim como em outro estudo com metodologia semelhante (52). Esse comportamento no pico do exercício aumenta a probabilidade de ser diabético, conforme demonstrado no modelo estatístico de predição da doença apresentado. Também observamos que no GDM houve redução na carga ajustada pela massa corporal, tanto no LA quanto no pico do exercício. O comportamento desta variável no DM pode ser devido a limitações na eficiência do coração como bomba, na redistribuição sanguínea para os músculos ativos e na extração de oxigênio pelo músculo esquelético (28; 33). No DM há redução da taxa de ajustamento circulatório em relação ao aumento da carga de trabalho (28), sendo assim, para essa população, quanto maior a carga, menor a eficiência desses sistemas.

Menores valores da FC no pico do exercício nos diabéticos têm sido observado em diversos estudos (18; 23; 52). Adicionalmente, no modelo preditivo apresentado utilizando variáveis do teste de exercício, menores valores de FC pico estão associadas à maior chance de

apresentar o DM. A resposta da FC ao exercício depende de inúmeros fatores, dentre eles a modulação do sistema nervoso autonômico cardíaco. Comumente o DM está associado com disfunção autonômica subclínica (108). O desbalanço simpático-vagal tem sido relatado (109), e pode ser um dos fatores que contribuem para o comportamento da FC ao exercício.

Em relação à regressão logística para predição do DM, sua interpretação adequada depende de se considerar as variáveis em conjunto, não sendo possível estimar a probabilidade utilizando-as isoladamente. Além disso, esses resultados não permitem avaliar a relação de causa e efeito entre as variáveis.

Verificamos que o modelo de predição do DM com as variáveis do teste de exercício reforçam o fato que o DM possui menor capacidade de adaptação ao estresse imposto pelo exercício, uma vez que a maior probabilidade de possuir a doença está associada à menor eficiência ventilatória (demostrada pelo VCO_2 e pelo VE/VCO_2), menor FC no pico do exercício e menor potência pico, sendo que esse modelo apresentou 90% de habilidade preditiva. Considerando que essas respostas são resultado da interação de diversos sistemas, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nessas alterações.

A redução da função pulmonar em repouso tem sido observada no DM, relacionada ao mau controle glicêmico (43; 45; 110) e à inflamação sistêmica (35; 50; 73), porém neste estudo não observamos diferenças entre o grupo diabético e controle nas variáveis espirométricas estudadas. Por outro lado, observamos através do modelo de predição de DM utilizando variáveis espirométricas uma habilidade preditiva de 81,9%. Nesse modelo foram inclusas as variáveis $FEF_{25-75\%}$ em valores absolutos, VEF_1/CVF e a RVVM. Maiores valores do $FEF_{25-75\%}$ indicaram maior probabilidade de ser diabético. Já em relação ao VEF_1/CVF e a RVVM, menores valores indicaram maior chance de ser diabético. O volume corrente foi incluso na equação de predição do DM porém não indicou um aumento de chance significativo.

A VVM geralmente é utilizada para testar a capacidade do indivíduo para manter um alto nível de ventilação. Nossos achados indicam que quanto menor essa capacidade, como exigido em um exercício extenuante por exemplo, maior o risco de apresentar o DM.

Os valores do $FEF_{25-75\%}$ não são comumente utilizados nos estudos de função pulmonar. Apesar disso, sabe-se que indivíduos com idade até 45 anos expiram, em geral, mais de 75% da CVF no primeiro segundo e indivíduos mais idosos expiram em geral mais de 70% (111). A manutenção de um maior fluxo de ar no período intermediário da expiração forçada pode indicar um aprisionamento de ar, o que é característico de pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC). Além disso, recentemente, demonstrou-se que o $FEF_{25-75\%}$ possui valor preditivo para óbito pela DPOC (27) e valores baixos de VEF_1/CVF indicam doença respiratória obstrutiva, sendo utilizados como critério diagnóstico (112). Estas alterações no teste de função pulmonar também são encontradas em indivíduos com asma, porém não há evidências na literatura que haja associação desta doença com o DM.

A DPOC tem sido associada ao aumento do risco de desenvolver o DM (113-115). Mannino e colaboradores (115) observaram que indivíduos com FEV_1/CVF menor que 70% e FEV_1 menor que 50% apresentava *odds ratio* (OR) para DM de 1,5 (1,1-1,9) e indivíduos com FEV_1/CVF menor que 70% e FEV_1 maior ou igual a 50% apresentavam OR para DM de 1,4 (1,2-1,6). No mesmo estudo, indivíduos com sintomas de doença respiratória porém sem anormalidades pulmonares, apresentaram OR para DM de 1,4 (1,3-1,6). A piora da função pulmonar apresentou uma significativa relação com a presença do DM (115), contudo, as razões dessas associações permanecem desconhecidas, mas podem estar relacionadas a fatores de risco comuns como tabagismo, inflamação sistêmica e outros fatores indefinidos (115; 116).

Embora nosso estudo não tenha verificado alterações na função pulmonar, a redução da VEF_1/CVF e aumento do $FEF_{25-75\%}$ como preditores do DM em indivíduos sem histórico de

tabagismo pode indicar que alterações nos fluxos e volumes pulmonares em pacientes portadores de DM parecem ocorrer antes das manifestações clínicas de queda de função pulmonar. Assim, a avaliação da função pulmonar pode ser adicionada à avaliação de outros fatores de risco já bem estabelecidos para o DM.

Um importante fator que influencia os volumes e capacidades pulmonares, além de estar envolvido com a fisiopatologia do DM, é a obesidade. Apesar da diferença de IMC entre os grupos estudados, os resultados da espirometria foram semelhantes. Corroborando esse achado, Pekkarinen e colaboradores (117) observaram que a composição corporal não apresentou relação com os resultados da espirometria em indivíduos com IMC até 30 kg/m². Um outro estudo recente demonstrou que embora o IMC tenha uma relação inversa com variáveis funcionais respiratórias, dentre elas CVF, VEF₁, FEF_{25-75%}, VEF₁/CVF, as alterações significativas ocorrem somente quando este índice excede 45 kg/m² (118).

A associação entre controle glicêmico e redução da função pulmonar tem sido relatada em alguns estudos. Davis e colaboradores (45) observaram que a exposição glicêmica (avaliada através da HbA_{1c}) foi um forte e consistente preditor negativo da função pulmonar sendo que o decréscimo da função estava associado ao tempo de diagnóstico. Dennis e colaboradores (110) avaliaram a influência do controle glicêmico na função pulmonar e inflamação sistêmica. Eles concluíram que diabéticos com mau controle glicêmico apresentam menores valores de CVF e VEF₁, estando o decréscimo da função pulmonar associado ao aumento de mediadores inflamatórios. Nossos dados indicam ausência de correlação entre a função pulmonar e o controle glicêmico. Resultados semelhantes aos nossos foram observados por outros autores (34; 39; 52).

Guvener e colaboradores (39) observaram difusão pulmonar diminuída no grupo diabético, correlacionando-a com a duração da doença, mas não com o controle glicêmico (39).

As principais causas de piora da função pulmonar em diabéticos têm sido atribuídas a microangiopatia dos capilares e artérias pulmonares (50) porém o teste de função pulmonar utilizado no presente estudo não é adequado para avaliar esse tipo de alteração.

A amostra de indivíduos diabéticos estudada apresentou níveis normais de PCR e esse marcador inflamatório não se correlacionou com as características clínicas, medidas de concentrações plasmáticas de lipídios e HbA_{1c} e os testes de função pulmonar e cardiopulmonar realizados. A presença de baixa capacidade funcional aeróbia independente dos níveis inflamatórios pode indicar que a inflamação sub-clínica não seja um fator predominante na redução do condicionamento físico no DM. Embora diversos estudos mostrem elevação da concentração de PCR associada ao DM (65), ao IMC (67; 119) ao baixo condicionamento cardiopulmonar (72; 120) e à redução da função pulmonar (73; 110), o histórico de tabagismo é um importante aspecto que comumente deixa de ser controlado nestes estudos. Tabagistas apresentam elevados níveis de PCR e ex-tabagistas tem concentrações de PCR dependentes da duração da cessação do hábito (121). A associação entre função pulmonar, inflamação e tabagismo tem sido descrito (122). O presente estudo incluiu somente indivíduos que nunca fumaram para reduzir os fatores confundidores relacionados à inflamação.

Por outro lado, há que ser considerado que em nosso estudo o grupo diabético fazia uso de diversos medicamentos que podem influenciar a inflamação. Entretanto, estes fármacos são aqueles comumente utilizados, por indivíduos portadores de DM encontrados na população e não só na amostra.

Embora diversos estudos tratem da relação entre inflamação sistêmica e DM, o número de estudos avaliando a expressão de citocinas em linfócitos é muito limitado. Estudos clássicos propõem que o defeito nos linfócitos T seria a explicação mais provável para as alterações na resposta imunológica descritos no DM (123; 124) há mais de três décadas.

Na amostra estudada não foram observadas diferenças na expressão de citocinas linfocitárias em amostras basais ou após estimulação de 6 horas. Corroborando nossos achados, Foss-Freitas e colaboradores (60) observaram que indivíduos com DM apresentaram porcentagens semelhantes de IFN- γ e IL-10 em níveis basais ou após estimulação, atribuindo esses achados aos efeitos anti-inflamatórios da insulina.

Em nosso estudo, o grupo diabético apresentou 10 amostras inviáveis para detecção das citocinas intracelulares em linfócitos T, enquanto no grupo controle, 4 amostras. Isso pode indicar possíveis alterações em linfócitos T de diabéticos, visto que após o descongelamento houve uma perda muito maior de amostras de células desse grupo. Stentz e Kitabchi (59) observaram em estudo *in vitro* que a insulina tem papel crucial na manutenção do estado ativo dos linfócitos T. Além disso, redução da quantidade de linfócitos tem sido descrita em indivíduos com DM (59). Nossos resultados podem indicar que diabéticos possuem linfócitos T mais vulneráveis à manipulação imposta durante o ensaio *in vitro*.

O uso da técnica que avalia a expressão intra-celular de citocinas tem sido defendida devido a fatores séricos de inúmeras populações celulares interferirem nas concentrações plasmáticas das citocinas (60). Adicionalmente, o papel dessas citocinas deveria ser investigado idealmente no sítio inflamatório em questão, ou seja, pulmão. São necessárias investigações mais específicas, metodologias mais sensíveis e maior tamanho amostral para verificar essas hipóteses.

6. CONCLUSÕES

Concluindo, os resultados obtidos confirmam a redução da capacidade cardiopulmonar no DM. Não foi observada alteração na avaliação dos mediadores inflamatórios (citocinas intra linfocitárias) e marcador de inflamação (PCR) estudados. A inflamação sistêmica associada ao DM pode ser influenciada por outros fatores ausentes na amostra estudada. Adicionalmente, os dados sugerem que alterações cardiopulmonares estão preditivamente associadas ao DM.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peres DS, Franco LJ, dos Santos MA: [Eating behavior among type 2 diabetes women]. *Rev Saude Publica* 40:310-317, 2006
2. Sartorelli DS, Franco LJ: [Trends in diabetes mellitus in Brazil: the role of the nutritional transition]. *Cad Saude Publica* 19 Suppl 1:S29-36, 2003
3. Nadeau KJ, Zeitler PS, Bauer TA, Brown MS, Dorosz JL, Draznin B, Reusch JE, Regensteiner JG: Insulin resistance in adolescents with type 2 diabetes is associated with impaired exercise capacity. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3687-3695, 2009
4. Marwick TH, Hordern MD, Miller T, Chyun DA, Bertoni AG, Blumenthal RS, Philippides G, Rocchini A: Exercise training for type 2 diabetes mellitus: impact on cardiovascular risk: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 119:3244-3262, 2009
5. Gomes MdB: Glitazones and the metabolic syndrome: mechanism of action, pathophysiology and therapeutic indications. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 50:271-280, 2006
6. Mota CSdA, Ribeiro C, Araújo GGd, Araújo MBd, Manchado-Gobatto FdB, Voltarelli FA, Oliveira CAMd, Luciano E, Mello MARd: Exercise training in the aerobic/anaerobic metabolic transition prevents glucose intolerance in alloxan-treated rats *BMC Endocrine Disorders* 8, 2008
7. Torquato MTCG, Junior RMM, Viana LAL, Souza RAHGd, Lanna CMM, Lucas JCB, Bidurin C, Foss MC: Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban population aged 30-69 years in Ribeirão Preto (São Paulo), Brazil. *Revista Paulista de Medicina* 121:224-230, 2003
8. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H: Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053, 2003
9. King H, Aubert R, Herman W: Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431, 1998

10. Bosi PL, Carvalho AM, Contrera D, Casale G, Pereira MA, Gronner MF, Diogo TM, Torquarto MTdCG, Oishi J, Leal AMdO: Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in the urban population of 30 to 79 years of the city of São Carlos, São Paulo. . *Arq Bras Endocrinol Metab* 53:726-732, 2009
11. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, Rami T, Brancati FL, Powe NR, Golden SH: Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 141:421-431, 2004
12. Kadoglou NP, Iliadis F, Angelopoulou N, Sailer N, Fotiadis G, Voliotis K, Vitta I, Liapis CD, Alevizos M: Cardiorespiratory capacity is associated with favourable cardiovascular risk profile in patients with Type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 23:160-166, 2009
13. Dennis RJ, Maldonado D, Rojas MX, Aschner P, Rondon M, Charry L, Casas A: Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and systemic inflammation: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med* 10:38
14. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ: *Robbins: Patologia Estrutural e Funcional*. Rio de Janeiro, Guanabara Kogan, 1996
15. Niranjana V, McBrayer DG, Ramirez LC, Raskin P, Hsia CC: Glycemic control and cardiopulmonary function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 103:504-513, 1997
16. Corrêa FHS, Taboada GF, Júnior CRMA, Faria AM, Clemente ELS, Fuks AG, Gomes MdB: Influência da Gordura Corporal no Controle Clínico e Metabólico de Pacientes Com Diabetes Mellitus Tipo 2. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 47:62-68, 2003
17. Geloneze B, Lamounier RN, Coelho OR: Postprandial Hyperglycemia: Treating its Atherogenic Potential. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 87:660-670, 2006

18. Brassard P, Ferland A, Bogaty P, Desmeules M, Jobin J, Poirier P: Influence of glycemic control on pulmonary function and heart rate in response to exercise in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 55:1532-1537, 2006
19. Seyoum B, Estacio RO, Berhanu P, Schrier RW: Exercise capacity is a predictor of cardiovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diab Vasc Dis Res* 3:197-201, 2006
20. Fang ZY, Sharman J, Prins JB, Marwick TH: Determinants of exercise capacity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28:1643-1648, 2005
21. McAuley PA, Myers JN, Abella JP, Tan SY, Froelicher VF: Exercise capacity and body mass as predictors of mortality among male veterans with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30:1539-1543, 2007
22. Nylen ES, Kokkinos P, Myers J, Faselis C: Prognostic effect of exercise capacity on mortality in older adults with diabetes mellitus. *J Am Geriatr Soc* 58:1850-1854
23. Komatsu WR, Gabbay MA, Castro ML, Saraiva GL, Chacra AR, de Barros Neto TL, Dib SA: Aerobic exercise capacity in normal adolescents and those with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Diabetes* 6:145-149, 2005
24. Wasserman K, Hansen JE, Sue DY, Stringer WW, Whipp BJ: *Principles of Exercise Testing and Interpretation*. Philadelphia, Williams & Wilkins, 1999
25. Neder JA, Nery LE: *Fisiologia Clínica do Exercício: Teoria e Prática* São Paulo, Artes Médicas, 2002
26. Pollock ML, Wilmore JH: *Exercícios na saúde e na doença. Avaliação e prescrição para prevenção e reabilitação*. Rio de Janeiro, MEDSI, 1993
27. Pereira CAC, Neder JA: Diretrizes para testes de função pulmonar. *J Pneumol*:S1-S41, 2002

28. Regensteiner JG: Type 2 diabetes mellitus and cardiovascular exercise performance. *Rev Endocr Metab Disord* 5:269-276, 2004
29. Fang ZY, Schull-Meade R, Downey M, Prins J, Marwick TH: Determinants of subclinical diabetic heart disease. *Diabetologia* 48:394-402, 2005
30. Poirier P, Bogaty P, Garneau C, Marois L, Dumesnil JG: Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 24:5-10, 2001
31. Regensteiner JG, Bauer TA, Reusch JE, Brandenburg SL, Sippel JM, Vogelsong AM, Smith S, Wolfel EE, Eckel RH, Hiatt WR: Abnormal oxygen uptake kinetic responses in women with type II diabetes mellitus. *J Appl Physiol* 85:310-317, 1998
32. Chipkin SR, Klugh SA, Chasan-Taber L: Exercise and diabetes. *Cardiol Clin* 19:489-505, 2001
33. Baldi JC, Aoina JL, Oxenham HC, Bagg W, Doughty RN: Reduced exercise arteriovenous O₂ difference in Type 2 diabetes. *J Appl Physiol* 94:1033-1038, 2003
34. Weisbrod CJ, Eastwood PR, O'Driscoll G, Green DJ: Abnormal ventilatory responses to hypoxia in Type 2 diabetes. *Diabet Med* 22:563-568, 2005
35. Tiengo A, Fadini GP, Avogaro A: The metabolic syndrome, diabetes and lung dysfunction. *Diabetes Metab* 34:447-454, 2008
36. Kaparianos A, Agyropoulou E, Sampsonas F, Karkoulas K, Tsiamita M, Spirouopoulos K: Pulmonary complications in diabetes mellitus. *Chronic Respiratory Disease* 5:101-108, 2008
37. Kodolova IM, Lysenko LV, Saltykov BB: Changes in the lungs in diabetes mellitus. *Arkh Patol* 44:35-40, 1982

38. Minette P, Buyschaert M, Rahier J, Veriter C, Frans A: Pulmonary Gas Exchange in Life-long Nonsmoking Patients with Diabetes mellitus. *Respiration* 66:20-24, 1998
39. Guvener N, Tutuncu NB, Akcay S, Eyuboglu F, Gokcel A: Alveolar gas exchange in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocr J* 50:663-667, 2003
40. Hsia CC, Raskin P: Lung involvement in diabetes: does it matter? *Diabetes Care* 31:828-829, 2008
41. Guazzi M, Brambilla R, Pontone G, Agostoni P, Guazzi P: Effects of non-insulin dependent diabetes mellitus on pulmonary function and exercise tolerance in chronic congestive heart failure. *American Journal of Cardiology* 89:191-197, 2002
42. Cooper BG, Taylor R, Alberti KGMM, Gibson GJ: Lung function in patients with diabetes mellitus. *Respiratory Medicine* 84:235-239, 1990
43. Davis TM, Knuiman M, Kendall P, Vu H, Davis WA: Reduced pulmonary function and its associations in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Res Clin Pract* 50:153-159, 2000
44. Meo SA: Significance of spirometry in diabetic patients. *International journal of Diabetes Mellitus* 2.:47-50, 2010
45. Davis WA, Knuiman M, Kendall P, Grange V, Davis TM: Glycemic exposure is associated with reduced pulmonary function in type 2 diabetes: the Fremantle Diabetes Study. *Diabetes Care* 27:752-757, 2004
46. Litonjua AA, Lazarus R, Sparrow D, Demolles D, Weiss ST: Lung function in type 2 diabetes: the Normative Aging Study. *Respir Med* 99, 2005
47. Mannino DM, Ford ES, Redd SC: Obstrutive and restritive lung disease and markers of inflammation: data from the Third National Health and Nutrition Examination. *The American Journal of Medicine* 114:758-762, 2003

48. Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD: Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. *Thorax* 59:574-580, 2004
49. Hankinson JL, Odencrantz JR, Fedan KB: Spirometric reference values from a sample of the general U.S. population. *Am J Respir Crit Care Med* 159:179-187, 1999
50. Klein OL, Krishnan JA, Glick S, Smith LJ: Systematic review of the association between lung function and Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 27:977-987
51. Ford ES, Mannino DM: Prospective association between lung function and the incidence of diabetes: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *Diabetes Care* 27:2966-2970, 2004
52. Benbassat CA, Stern E, Kramer M, Lebzelter J, Blum I, Fink G: Pulmonary function in patients with diabetes mellitus. *Am J Med Sci* 322:127-132, 2001
53. King GL: The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications. *J Periodontol* 79:1527-1534, 2008
54. Goldberg RB: Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3171-3182, 2009
55. Pickup JC: Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:813-823, 2004
56. Moreno PM, Murcia AM, Palacios IF, Leon MN, Bernardi VH, Fuster V, Fallon JT: Coronary composition macrophage infiltration in atherectomy specimens from patients with diabetes mellitus. *Circulation* 102:2180-2184, 2000
57. Garg R, Tripathy D, Dandona P: Insulin resistance as a proinflammatory state: mechanisms, mediators, and therapeutic interventions. *Curr Drug Targets* 4:487-492, 2003

58. Dandona P, Aljada A, Mohanty P, Ghanim H, Hamouda W, Assian E, Ahmad S: Insulin inhibits intranuclear nuclear factor kappaB and stimulates IkappaB in mononuclear cells in obese subjects: evidence for an anti-inflammatory effect? *J Clin Endocrinol Metab* 86:3257-3265, 2001
59. Stentz FB, Kitabchi AE: Activated T lymphocytes in Type 2 diabetes: implications from in vitro studies. *Curr Drug Targets* 4:493-503, 2003
60. Foss-Freitas MC, Foss NT, Donadi EA, Foss MC: Effect of the glyceemic control on intracellular cytokine production from peripheral blood mononuclear cells of type 1 and type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 82:329-334, 2008
61. Vlassara H, Brownlee M, Manogue KR, Dinarello CA, Pasagian A: Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science* 240:1546-1548, 1988
62. Vojarova B, Weyer C, Lindsay RS, Pratley RE, Bogardus C, Tataranni PA: High white blood cell count is associated with a worsening of insulin sensitivity and predicts the development of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:455-461, 2002
63. Kony S, Zureik M, Driss F, Neukirch C, Leynaert B, Neukirch F: Association of bronchial hyperresponsiveness and lung function with C-reactive protein (CRP): a population based study. *Thorax* 59, 2004
64. Lee CC, Adler AI, Sandhu MS, Sharp SJ, Forouhi NG, Erqou S, Luben R, Bingham S, Khaw KT, Wareham NJ: Association of C-reactive protein with type 2 diabetes: prospective analysis and meta-analysis. *Diabetologia* 52:1040-1047, 2009
65. King DE, Mainous AG, 3rd, Buchanan TA, Pearson WS: C-reactive protein and glyceemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care* 26:1535-1539, 2003
66. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM: C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA* 286:327-334, 2001

67. Ford ES: Body mass index, diabetes, and C-reactive protein among U.S. adults. *Diabetes Care* 22:1971-1977, 1999
68. Natali A, Toschi E, Baldeweg S, Ciociaro D, Favilla S, Sacca L, Ferrannini E: Clustering of insulin resistance with vascular dysfunction and low-grade inflammation in type 2 diabetes. *Diabetes* 55:1133-1140, 2006
69. Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Alokail MS, Alkharfy KM, Shaik NA, Draz HM, Bamakhramah A, Sabico SL: Gender-specific associations between insulin resistance, hypertension, and markers of inflammation among adult Saudis with and without diabetes mellitus type 2. *Adv Med Sci* 55:179-185
70. Popa C, Netea MG, van Riel PL, van der Meer JW, Stalenhoef AF: The role of TNF-alpha in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res* 48:751-762, 2007
71. Ruotsalainen E, Salmenniemi U, Vauhkonen I, Pihlajamaki J, Punnonen K, Kainulainen S, Laakso M: Changes in Inflammatory Cytokines Are Related to Impaired Glucose Tolerance in Offspring of Type 2 Diabetic Subjects. *Diabetes Care* 29:2714-2720, 2006
72. McGavock JM, Mandic S, Vonder Muhll I, Lewanczuk RZ, Quinney HA, Taylor DA, Welsh RC, Haykowsky M: Low cardiorespiratory fitness is associated with elevated C-reactive protein levels in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27:320-325, 2004
73. Lee HM, Le TV, Lopez VA, Wong ND: Association of C-reactive protein with reduced forced vital capacity in a nonsmoking U.S. population with metabolic syndrome and diabetes. *Diabetes Care* 31:2000-2002, 2008
74. Church TS, Barlow CE, Earnest CP, Kampert JB, Priest EL, Blair SN: Associations between cardiorespiratory fitness and C-reactive protein in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1869-1876, 2002

75. Wei M, Gibbons LW, Kampert JB, Nichaman MZ, Blair SN: Low cardiorespiratory fitness and physical inactivity as predictors of mortality in men with type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 132:605-611, 2000
76. Huoya MdO, Penalva RA, Alves SR, Feitosa GS, Galhena S, Ladeia AMT: Comparision of inflammatory Biomarkers between Diabetic and Non-Diabetic Patients with Unstable Angina. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 92:269-274, 2009
77. Foss-Freitas MC, Foss NT, Rassi DM, Donadi EA, Foss MC: Evaluation of cytokine production from peripheral blood mononuclear cells of type 1 diabetic patients. *Ann N Y Acad Sci* 1150:290-296, 2008
78. Foss-Freitas MC, Foss NT, Donadi EA, Foss MC: Effect of metabolic control on the in vitro proliferation of peripheral blood mononuclear cells in type 1 and type 2 diabetic patients. *Sao Paulo Med J* 124:219-222, 2006
79. Benjamini E, Coico R, Sunshine G: *Imunologia*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002
80. Tsiavou A, Degiannis D, Hatziagelaki E, Koniavitou K, Raptis SA: Intracellular IFN-gamma production and IL-12 serum levels in latent autoimmune diabetes of adults (LADA) and in type 2 diabetes. *J Interferon Cytokine Res* 24:381-387, 2004
81. Pakala SV, Kurrer MO, Katz JD: T helper 2 (Th2) T cells induce acute pancreatitis and diabetes in immune-compromised nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 186:299-306, 1997
82. Van der Poll T, Romijn JA, Endert E, Borm JJ, Buller HR, Sauerwein HP: Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *Am J Physiol* 261:E457-465, 1991
83. Abbas AK, Lichtman AH: *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro, Elsevier, 2005

84. Mocellin S, Marincola F, Rossi CR, Nitti D, Lise M: The multifaceted relationship between IL-10 and adaptive immunity: putting together the pieces of a puzzle. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:61-76, 2004
85. Chang YH, Ho KT, Lu SH, Huang CN, Shiau MY: Regulation of glucose/lipid metabolism and insulin sensitivity by interleukin-4. *Int J Obes (Lond)*
86. Manirarora JN, Parnell SA, Hu YH, Kosiewicz MM, Alard P: NOD dendritic cells stimulated with Lactobacilli preferentially produce IL-10 versus IL-12 and decrease diabetes incidence. *Clin Dev Immunol* 2011:630187
87. Ohshima K, Mogi M, Jing F, Iwanami J, Tsukuda K, Min LJ, Higaki J, Horiuchi M: Roles of Interleukin 17 in Angiotensin II Type 1 Receptor-Mediated Insulin Resistance. *Hypertension* 59:493-499
88. Sumarac-Dumanovic M, Stevanovic D, Ljubic A, Jorga J, Simic M, Stamenkovic-Pejkovic D, Starcevic V, Trajkovic V, Micic D: Increased activity of interleukin-23/interleukin-17 proinflammatory axis in obese women. *Int J Obes (Lond)* 33:151-156, 2009
89. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK: IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517, 2009
90. Van Belle TL, Esplugues E, Liao J, Juntti T, Flavell RA, von Herrath MG: Development of autoimmune diabetes in the absence of detectable IL-17A in a CD8-driven virally induced model. *J Immunol* 187:2915-2922
91. American Heart Association: Exercise testing and training of apparently health individuals: A handbook for physiicians. 1972, p. 5
92. American Diabetes Association: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. . *Diabetes Care* 26:5-20, 2003

93. WHO: Physical status: the use and interpretation of anthropometry. . In *WHO Technical Report Series 854* Geneva, World Health Organization 1995
94. Sociedade Brasileira de Cardiologia: V Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial. *Arq Bras Cardiol* 2007
95. Lukaski HC, Johnson PE, Bolonchuk WW, Lykken GI: Assessment of fat-free mass using bioelectrical impedance measurements of the human body. *Am J Clin Nutr* 41:810-817, 1985
96. Boyum A: Separation of blood leucocytes, granulocytes and lymphocytes. *Tissue Antigens* 4:269-274, 1974
97. Mezzani A, Agostoni P, Cohen-Solal A, Corra U, Jegier A, Kouidi E, Mazic S, Meurin P, Piepoli M, Simon A, Laethem CV, Vanhees L: Standards for the use of cardiopulmonary exercise testing for the functional evaluation of cardiac patients: a report from the Exercise Physiology Section of the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 16:249-267, 2009
98. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 159:197-207, 1993
99. *Detecting Intracellular Cytokines in Activated Lymphocytes*, BD Biosciences, 1999
100. Simoes HG, Moreira SR, Moffatt RJ, Campbell CS: [Methods to identify the anaerobic threshold for type-2 diabetic and non-diabetic subjects]. *Arq Bras Cardiol* 94:71-78
101. McGavock J, Mandic S, Lewanczuk R, Koller M, Muhll IV, Quinney A, Taylor D, Welsh R, Haykowsky M: Cardiovascular adaptations to exercise training in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 3:3, 2004
102. Belli T, Ackermann MA, Ribeiro LF, Langeani R, Galdino da Silva R, Baldissera V: Lactate and ventilatory thresholds in type 2 diabetic women. *Diabetes Res Clin Pract* 76:18-23, 2007

103. Simoneau JA, Kelley DE: Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol* 83:166-171, 1997
104. Hsia CC, Raskin P: Lung function changes related to diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther* 9 Suppl 1:S73-82, 2007
105. Middlebrooke AR, Armstrong N, Welsman JR, Shore AC, Clark P, MacLeod KM: Does aerobic fitness influence microvascular function in healthy adults at risk of developing Type 2 diabetes? *Diabet Med* 22:483-489, 2005
106. Regensteiner JG, Sippel J, McFarling ET, Wolfel EE, Hiatt WR: Effects of non-insulin-dependent diabetes on oxygen consumption during treadmill exercise. *Med Sci Sports Exerc* 27:875-881, 1995
107. Dwyer GB, Wallace JP, Whaley MH: Influence of metabolic control on the ventilatory threshold in adults with non insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res* 25:39-46, 1994
108. Schmid H: [Cardiovascular impact of the autonomic neuropathy of diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51:232-243, 2007
109. De Angelis K, D'Agord Schaan B, Rodrigues B, Malfitano C, Irigoyen MC: [Cardiovascular autonomic dysfunction in experimental diabetes mellitus]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 51:185-194, 2007
110. Dennis RJ, Maldonado D, Rojas MX, Aschner P, Rondon M, Charry L, Casas A: Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and systemic inflammation: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med* 10:38, 2010
111. Pereira CAC, Barreto SP, Simões JG, Pereira FWL, Gerstler JG, Nakatani J: Valores de referência para espirometria em uma amostra da população brasileira adulta. *J Pneumol* 18:10-22, 1992

112. Global Strategy for the diagnosis, management, and prevention of COPD. In *Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD)*, 2011
113. Rana JS, Mittleman MA, Sheikh J, Hu FB, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Barr RG, Camargo CA, Jr.: Chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 27:2478-2484, 2004
114. Engstrom G, Janzon L: Risk of developing diabetes is inversely related to lung function: a population-based cohort study. *Diabet Med* 19:167-170, 2002
115. Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F: Prevalence and outcomes of diabetes, hypertension and cardiovascular disease in COPD. *Eur Respir J* 32:962-969, 2008
116. Sevenoaks MJ, Stockley RA: Chronic Obstructive Pulmonary Disease, inflammation and co-morbidity--a common inflammatory phenotype? *Respir Res* 7:70, 2006
117. Pekkarinen E, Vanninen E, Lansimies E, Kokkarinen J, Timonen KL: Relation between body composition, abdominal obesity, and lung function. *Clin Physiol Funct Imaging* 32:83-88
118. D'Avila Melo SM, de Melo VA, de Menezes Filho RS, Santos FA: Effects of progressive increase in body weight on lung function in six groups of body mass index. *Rev Assoc Med Bras* 57:509-515
119. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B: Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 17:4-12, 2006
120. Jae SY, Heffernan KS, Lee MK, Fernhall B, Park WH: Relation of cardiorespiratory fitness to inflammatory markers, fibrinolytic factors, and lipoprotein(a) in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 102:700-703, 2008
121. Ohsawa M, Okayama A, Nakamura M, Onoda T, Kato K, Itai K, Yoshida Y, Ogawa A, Kawamura K, Hiramori K: CRP levels are elevated in smokers but unrelated to the number of

cigarettes and are decreased by long-term smoking cessation in male smokers. *Prev Med* 41:651-656, 2005

122. Gan WQ, Man SF, Sin DD: The interactions between cigarette smoking and reduced lung function on systemic inflammation. *CHEST* 127:558-564, 2005

123. Dolkart RE, Halpern B, Perlman J: Comparison of antibody responses in normal and alloxan diabetic mice. *Diabetes* 20:162-167, 1971

124. Mahmoud AA, Rodman HM, Mandel MA, Warren KS: Induced and spontaneous diabetes mellitus and suppression of cell-mediated immunologic responses. Granuloma formation, delayed dermal reactivity and allograft rejection. *J Clin Invest* 57:362-367, 1976

8. APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE A

FRANCISCO CO, CATAI AM, MOURA SCG, LOPES SLB, BENZE BG, DEL VALE AM, LEAL AMO. Condicionamento cardiopulmonar está diminuído e não correlacionado com os níveis de proteína C-reativa em adultos com diabetes mellitus.

Versão em inglês do manuscrito submetido ao periódico *Diabetes Research and Clinical Practice*

Elsevier Editorial System(tm) for Diabetes Research and Clinical Practice
Manuscript Draft

Manuscript Number: DIAB-D-12-00270

Title: Cardiorespiratory Fitness is decreased and not correlated with C-Reactive Protein Levels in Adults with Diabetes Mellitus

Article Type: Brief Report (1000 words)

Keywords: Diabetes Mellitus; cardiopulmonary exercise test; glycemic control; C-reactive protein.

Corresponding Author: Miss Cristina Oliveira Francisco, Master in Physical Therapy in progress

Corresponding Author's Institution: Federal University of São Carlos

First Author: Cristina O Francisco, Master in Physical Therapy in progress

Order of Authors: Cristina O Francisco, Master in Physical Therapy in progress; Aparecida M Catai, PhD; Silvia Cristina G Moura, Master in Physical Therapy; Sérgio Luiz B Lopes, PhD; Benedito G Benze, PhD; Adriano M Del Vale; Angela M Leal, PhD

Abstract: We evaluated the relationship between glycemic control, C-reactive protein (CRP) levels and cardiorespiratory fitness in adult patients with Diabetes Mellitus (DM). Nineteen men with diabetes and nineteen control subjects age and sex-matched were studied. In conclusion, cardiorespiratory fitness is reduced in DM and not correlated with CRP levels or HbA1c.

Cover letter (Inc. Statement of Authorship)

Brazil, March 12, 2012.

Dear editor,

The choice of submitting the article "Cardiorespiratory Fitness is decreased and not correlated with C-Reactive Protein Levels in Adults with Diabetes Mellitus" to journal *Diabetes Research and Clinical Practice* it was due to high quality of the magazine in issues concerning diabetes complications. The article refers about relationship among cardiorespiratory fitness, glycemic control and C-reactive protein levels in patients with diabetes. Understand the mechanisms involved with reduced capacity to perform exercise in patient with diabetes are relevant because its impact in life activities. I believe the theme of this article is consistent with the policy of your journal.

Sincerely

Cristina de Oliveira Francisco

Master Degree in progress - Federal University of São Carlos - Brazil

*Diabetes Research and Clinical Practice***Author Consent Form**

Please complete this form for all manuscript submissions to *Diabetes Research and Clinical Practice* (DRCP). Please scan the completed form and transmit it to the Editorial Office via the Elsevier Editorial System with the manuscript. If you are unable to do this, please contact the Editorial Office at diab@elsevier.com to organise an alternative way of submitting the form.

Title of Manuscript:

Cardiorespiratory Fitness is decreased and not correlated with C-Reactive Protein Levels in Adults with Diabetes Mellitus

Name of corresponding author: Cristina de Oliveira Francisco

"All the authors have made a significant contribution to this manuscript, have seen and approved the final manuscript, and have agreed to its submission to the DRCP".

Author's Name**Signature**

Cristina O. Francisco

Cristina O. Francisco

Aparecida M. Catai

Aparecida M. Catai

Sílvia C.G. Moura

Sílvia C.G. Moura

Sérgio L.B. Lopes

Sérgio L.B. Lopes

Adriano M. Del Vale

Adriano M. Del Vale

Angela M.O. Leal

Angela M.O. Leal

Benedito Galvão Benze

Benedito Galvão Benze

(Please note that this form must be signed by ALL authors)

Benedito Galvão Benze

Cardiorespiratory Fitness is decreased and not correlated with C-Reactive Protein Levels in Adults with Diabetes Mellitus

Cristina O. Francisco¹, Aparecida M. Catai¹, Silvia C. G Moura¹, Sérgio L.B. Lopes², Benedito G. Benze³, Adriano M. Del Vale¹, Angela M.O. Leal².

Departments of Physiotherapy¹, Medicine², and Statistic³ Federal University of São Carlos– SP – Brazil.

Short title: Cardiorespiratory Fitness and Diabetes

Corresponding author:

Cristina de Oliveira Francisco

Department of Physiotherapy

Federal University of São Carlos

Rod. Washington Luís, km 235

CEP 13.565-905

São Carlos – SP

cristinaft05@gmail.com

Abstract

We evaluated the relationship between glycemic control, C-reactive protein (CRP) levels and cardiorespiratory fitness in adult patients with Diabetes Mellitus (DM). Nineteen men with diabetes and nineteen control subjects age and sex-matched were studied. In conclusion, cardiorespiratory fitness is reduced in DM and not correlated with CRP levels or HbA_{1c}.

Keywords: Diabetes Mellitus, cardiopulmonary exercise test, glycemic control, C-reactive protein

1. Introduction

Diabetes mellitus (DM) has been associated with the impairment of cardiorespiratory fitness [1, 2]. However, the results regarding cardiopulmonary dysfunction and its underlying mechanisms in DM are still controversial.

The objective of this study was to evaluate the relationship between glycemic control assessed by HbA_{1c}, C-reactive protein (CRP) levels and cardiorespiratory fitness in adult patients with DM.

2. Methods

After providing written informed consent, nineteen men with diabetes (aged 51 ± 1 years; mean \pm SE) and nineteen control subjects age and sex-matched (aged 49 ± 2 years; mean \pm SE) participated in the study, which was approved by the Ethics Committee of Federal University of São Carlos.

All subjects were sedentary with oxygen consumption (VO_{2peak}) considered very low, low or reasonable according to the exercise capacity classification of American Heart Association [3].

On the experimental day, after 10-12 hours of fasting, the subjects underwent anthropometrical evaluation and blood samples were drawn for measurement of hemoglobin A1C (HbA_{1c}) and plasma concentration of CRP (Siemens, Tarrytown, NY, USA).

Cardiopulmonary Exercise Test. Incremental exercise test was performed on a cycloergometer with electromagnetic braking (Quinton Corival 400, Seattle, WA, USA), and cardiopulmonary data were continuously collected with a metabolic unit (CPX/D, MedGraphics, St. Paul, MN, USA): oxygen consumption (VO_2), carbon dioxide production (VCO_2), minute ventilation (VE) and respiratory exchange ratio (RER) (VCO_2/VO_2). The workload increases, range 13-22W/min,

were determined for each subject according to the formula proposed by Wasserman et al. [4]. $\text{VO}_{2\text{peak}}$ and VO_2 at anaerobic threshold (AT) were measured by a standard technique [4]. During the exercise, subjects maintained a speed of 60 rpm. Heart rate (HR) was continuously monitored and blood pressure was measured every 2 minutes. The test was symptom limited [5]. It was interrupted when blood pressure reached the limits: systolic blood pressure (SBP) higher than 200 mmHg or diastolic blood pressure (DBP) higher than 120 mmHg or when subject referring chest pain, dyspnea and/or exhaustion evaluated with Borg Scale (CR10).

Statistical analysis. All results are expressed as means \pm SE. The Shapiro-Wilk test was used to test the normality of distribution. Group differences of variables were compared using Student's independent sample *t* test or Man-Whitney test. Relationships between variables were determined by Pearson or Spearman correlation coefficient (*r*). P value < 0.05 was considered statistically significant. All analyses were performed using Minitab software program version 15.0 for Windows.

3. Results

Control subjects and individuals with DM were not different in age, anthropometric parameters, and CRP (Table 1). BMI and resting HR were significantly higher in individuals with DM (Table 1). The average duration of diabetes was 11 years (range, 2-25 years) and the HbA_{1c} mean levels were 8.4% (range, 6-12.9%) (Table 1).

Ventilatory equivalent for oxygen and for carbon dioxide (VE/VO_2 and VE/VCO_2) were higher and the VO_2 at AT were lower, in individuals with DM than in control subjects ($p < 0.05$). The workload adjusted by weight was lower in individuals with DM at AT and exercise peak. There was no other difference in cardiorespiratory variables at AT between the groups (Table 2).

At the exercise peak, work (w), HR and VO_2 were significantly lower in DM than in control group. In addition, the individuals with DM had higher RER than control subjects (Table 2). There was no other difference in cardiorespiratory variables at exercise peak between groups (Table 2).

There was no correlation between CRP or HbA_{1c} level and cardiopulmonary variables (data not shown).

4. Discussion

In this study, we have shown that subjects with DM have decreased cardiopulmonary fitness which is not correlated with glycemic control and CRP.

Previous studies have demonstrated reduced both VO_2 at AT and VO_{2peak} in subjects with diabetes [1, 6-10]. These disarrangements have been attributed to micro- and macro-vascular disease independent of body weight; however the underlying mechanisms have been poorly investigated.

Both, HR and RER were altered in patients with diabetes. Decreased HR in DM could be associated with subclinical autonomic dysfunction and high values of RER in DM would be expected due to the increase in anaerobic metabolism and diminished oxidative capacity of skeletal muscle [8, 11].

There was no difference in $\Delta VO_2 / \Delta W$ between the groups, however Regensteiner et al. [2] reported lower $\Delta VO_2 / \Delta W$ values in DM. Furthermore, subjects with DM showed reduced workload adjusted by weight. This may be due to limitations in cardiac output, blood flow redistribution to working muscle, and skeletal muscle O_2 extraction [8].

Regarding the impact of glycemic control on VO_{2peak} and exercise capacity in subjects with diabetes, there are conflicting data [9, 12, 13]. Our results are in accordance with other

studies [9, 14, 15] which did not observe any significant relationship between blood glucose control, assessed by HbA_{1c}, and exercise capacity in adults with DM.

In this sample of subjects with diabetes, CRP levels were within the normal range. This may indicate that low grade inflammation is not the predominant causing factor to decreased fitness in DM. Although many studies demonstrated elevated CRP concentration associated with DM [16, 17], smoking status is an important aspect that is not usually controlled. Smokers have elevated CRP levels and past smokers have CRP levels dependent on duration of cessation [18] and the association between lung function and inflammation in this group has been reported [19]. However, the influence of smoking status and low grade inflammation in subjects with DM is not established. Our study, all subjects had never smoked to minimize the confounders factors to inflammation.

In conclusion, the decreased cardiorespiratory fitness observed in this study is not correlated with CRP levels and glycemic control. The inflammatory changes associated with DM reported by other studies may be influenced by factors absent in our study. The association between exercise capacity and DM needs clarification.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments

This study had the financial support of Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

C.O.F researched data and wrote the manuscript. S.C.G.M and A.M.D.V researched data. S.L.B.L and B.G.B. researched data and reviewed the manuscript. A.M.C and A.M.O.L contributed to experimental design, the discussion and reviewed/edited the manuscript.

REFERENCES

- [1] Komatsu WR, Barros Neto TL, Chacra AR, Dib SA. Aerobic exercise capacity and pulmonary function in athletes with and without type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33:2555-2557.
- [2] Regensteiner JG, Bauer TA, Reusch JE, Brandenburg SL, Sippel JM, Vogel song AM, et al. Abnormal oxygen uptake kinetic responses in women with type II diabetes mellitus. *J Appl Physiol* 1998; 85:310-317.
- [3] Association AH. Exercise testing and training of apparently health individuals: a handbook for physicians. Dallas: American Heart Association; 1972.
- [4] Wasserman K, Hansen JE, Sue DY, Stringer WW, Whipp BJ. Principles of Exercise Testing and Interpretation. 3 edn. Philadelphia: Williams & Wilkns; 1999.
- [5] Mezzani A, Agostoni P, Cohen-Solal A, Corra U, Jegier A, Kouidi E, et al. Standards for the use of cardiopulmonary exercise testing for the functional evaluation of cardiac patients: a report from the Exercise Physiology Section of the European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; 16:249-267.
- [6] McGavock J, Mandic S, Lewanczuk R, Koller M, Muhll IV, Quinney A, et al. Cardiovascular adaptations to exercise training in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2004; 3:3.
- [7] Nadeau KJ, Zeitler PS, Bauer TA, Brown MS, Dorosz JL, Draznin B, et al. Insulin resistance in adolescents with type 2 diabetes is associated with impaired exercise capacity. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:3687-3695.
- [8] Baldi JC, Aoina JL, Oxenham HC, Bagg W, Doughty RN. Reduced exercise arteriovenous O₂ difference in Type 2 diabetes. *J Appl Physiol* 2003; 94:1033-1038.

- [9] Brassard P, Ferland A, Bogaty P, Desmeules M, Jobin J, Poirier P. Influence of glycemic control on pulmonary function and heart rate in response to exercise in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2006; 55:1532-1537.
- [10] Benbassat CA, Stern E, Kramer M, Lebzelter J, Blum I, Fink G. Pulmonary function in patients with diabetes mellitus. *Am J Med Sci* 2001; 322:127-132.
- [11] Simoneau JA, Kelley DE. Altered glycolytic and oxidative capacities of skeletal muscle contribute to insulin resistance in NIDDM. *J Appl Physiol* 1997; 83:166-171.
- [12] Niranjan V, McBrayer DG, Ramirez LC, Raskin P, Hsia CC. Glycemic control and cardiopulmonary function in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 1997; 103:504-513.
- [13] Fang ZY, Sharman J, Prins JB, Marwick TH. Determinants of exercise capacity in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28:1643-1648.
- [14] Regensteiner JG, Sippel J, McFarling ET, Wolfel EE, Hiatt WR. Effects of non-insulin-dependent diabetes on oxygen consumption during treadmill exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1995; 27:875-881.
- [15] Dwyer GB, Wallace JP, Whaley MH. Influence of metabolic control on the ventilatory threshold in adults with non insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res* 1994; 25:39-46.
- [16] McGavock JM, Mandic S, Vonder Muhll I, Lewanczuk RZ, Quinney HA, Taylor DA, et al. Low cardiorespiratory fitness is associated with elevated C-reactive protein levels in women with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27:320-325.
- [17] King DE, Mainous AG, 3rd, Buchanan TA, Pearson WS. C-reactive protein and glycemic control in adults with diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26:1535-1539.

[18] Ohsawa M, Okayama A, Nakamura M, Onoda T, Kato K, Itai K, et al. CRP levels are elevated in smokers but unrelated to the number of cigarettes and are decreased by long-term smoking cessation in male smokers. *Prev Med* 2005; 41:651-656.

[19] Gan WQ, Man SF, Sin DD. The interactions between cigarette smoking and reduced lung function on systemic inflammation. *CHEST* 2005; 127:558-564.

Table 1 - Clinical and laboratory characteristics

| | Control subjects | Individuals with DM | P |
|---------------------------|------------------|---------------------|---------|
| N | 19 | 19 | - |
| Age (years) | 48.8 ± 7.5 | 51.2 ± 5.9 | 0.16 |
| Weight (kg) | 76.6 ± 9.0 | 85.5 ± 13.7 | 0.02* |
| Height (m) | 1.73 ± 0.08 | 1.73 ± 0.1 | 0.97 |
| BMI (kg/m ²) | 25.6 ± 1.91 | 28.7 ± 4.4 | 0.001* |
| Duration of DM (years) | - | 11 ± 1.5 | - |
| Resting HR (beats/min) | 71.3 ± 9.05 | 78.3 ± 9.78 | 0.03* |
| Resting SBP (mmHg) | 123 ± 9.5 | 125 ± 15.8 | 0.48 |
| Resting DBP (mmHg) | 85 ± 7.0 | 85 ± 10.7 | 0.81 |
| HbA1c (%) | 5.73 ± 0.1 | 8.4 ± 0.4 | <0.001* |
| Total cholesterol (mg/dl) | 210.1 ± 0.4 | 189.9 ± 1.6 | 0.29 |
| HDL cholesterol (mg/dl) | 48.0 ± 10.6 | 45.6 ± 11.6 | 0.52 |
| LDL cholesterol (mg/dl) | 121.6 ± 35.6 | 113.8 ± 30.7 | 0.49 |
| Triglycerides (mg/dl) | 170.2 ± 110.6 | 147.5 ± 78.2 | 0.46 |
| CRP (mg/L) | 0.7 ± 0.7 | 0.88 ± 0.9 | 0.75 |

Data are means ± SD *P < 0.05 vs. control subjects.

Table 2 - Cardiopulmonary exercise test parameters

| | Control | Individuals with | P | Control | Individuals with | P |
|-----------------------------|----------------------|----------------------|------------------|----------------------|----------------------|-------------------|
| | subjects | DM | | subjects | DM | |
| | AT | | | peak | | |
| Work (W) | 82.5 ± 19.8 | 72.2 ± 17.8 | 0.24 | 158.3 ± 22.3 | 135.1 ± 25.2 | 0.006* |
| HR (beats/min) | 102.5 ± 14.1 | 104.9 ± 10.5 | 0.55 | 148.9 ± 12.24 | 138.6 ± 10.26 | 0.009* |
| SBP (mmHg) | 155 ± 16.8 | 162 ± 16.7 | 0.20 | 183 ± 13.8 | 186 ± 17.7 | 0.57 |
| DBP (mmHg) | 89 ± 7.4 | 95 ± 12.2 | 0.17 | 97 ± 10.5 | 99 ± 13.9 | 0.90 |
| RER | 0.88 ± 0.06 | 0.90 ± 0.05 | 0.20 | 1.08 ± 0.10 | 1.15 ± 0.11 | 0.04* |
| VO ₂ (ml/kg/min) | 14.1 ± 3.4 | 12.2 ± 2.2 | 0.04* | 24.2 ± 3.2 | 18.9 ± 2.8 | <0.001* |
| VCO ₂ (ml/min) | 931.9 ± 194.1 | 924.8 ± 162.2 | 0.90 | 1972.1 ± 260 | 1852.7 ± 330 | 0.30 |
| VE (L/min) | 25.9 ± 5.7 | 26.8 ± 4.9 | 0.6 | 57.6 ± 11.8 | 55.7 ± 12.6 | 0.64 |
| Oxygen Pulse (ml/beat) | 10.4 ± 2.1 | 9.8 ± 1.5 | 0.29 | 12.3 ± 2.1 | 11.8 ± 2.3 | 0.43 |
| VE/VO ₂ | 24.5 ± 2.3 | 26.2 ± 2.4 | 0.03* | 31.4 ± 5.1 | 34.3 ± 5.6 | 0.10 |
| VE/VCO ₂ | 27.8 ± 2.8 | 29.2 ± 2.4 | <0.001 | 28.9 ± 4.4 | 29.8 ± 3.13 | 0.46 |
| ΔVO ₂ / ΔW | 9.33 ± 1.4 | 9.72 ± 1.6 | 0.45 | 10.16 ± 1.45 | 9.85 ± 1.59 | 0.54 |
| Work/weight (W/kg) | 1.1 ± 0.3 | 0.9 ± 0.2 | 0.02* | 2.1 ± 0.3 | 1.6 ± 0.2 | <0.001* |

Data are means ± SD: *P < 0.05 vs. control subjects.

APÊNDICE B - Análise e expressão de citocinas intracelulares em linfócitos

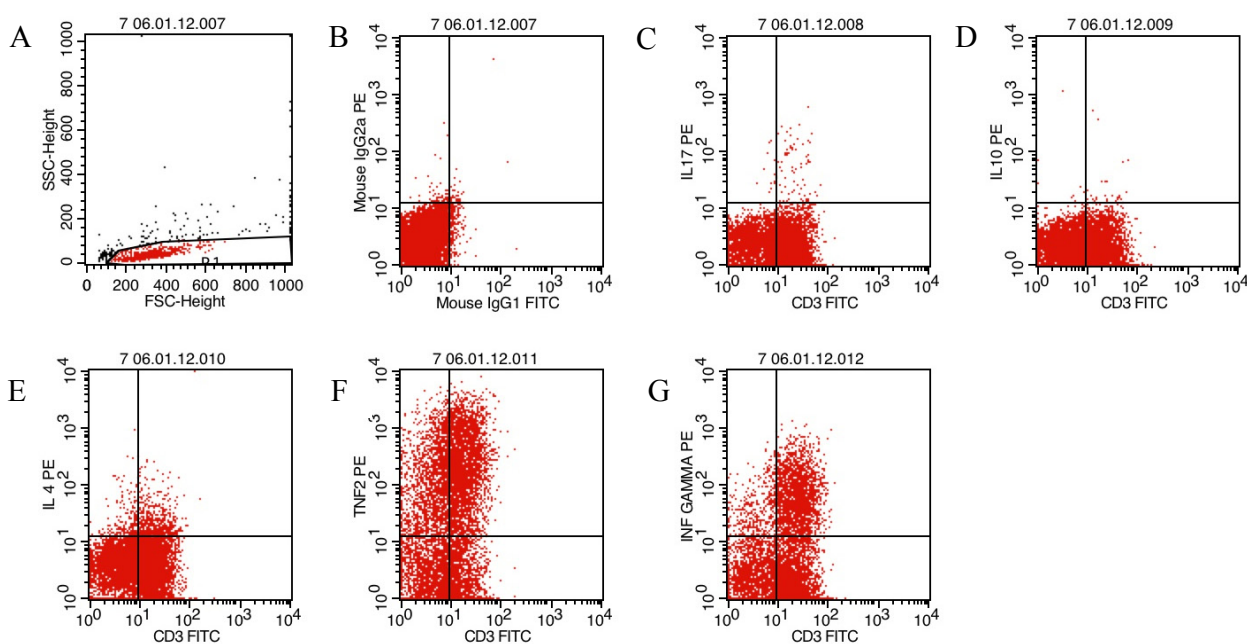


Figura B.1. Expressão basal de citocinas intracelulares linfocitárias.

(A) Gate na população de linfócitos estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC); (B) *Dot-plot* do isotipo controle; (C), (D), (E), (F) e (G) *Dot-plot* da expressão basal de citocinas em linfócito T CD3⁺ e as citocinas IL-17, IL-10, IL-4, TNF- α e IFN- γ , respectivamente.

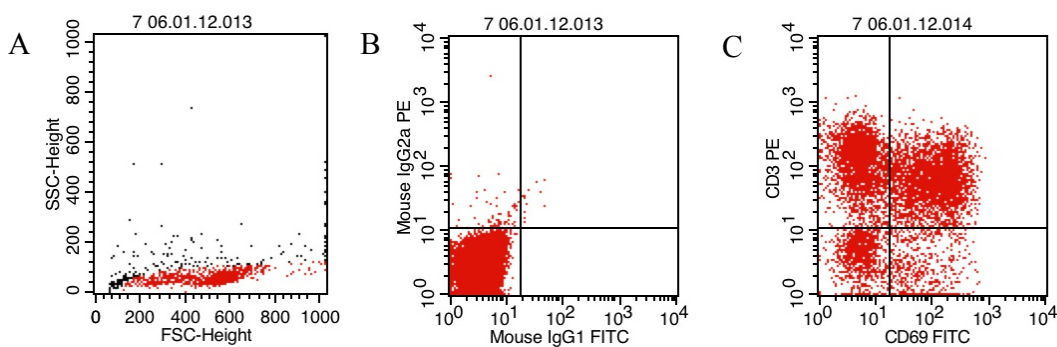


Figura B.2. Expressão de CD69 em linfócitos estimulados com PMA e Ionomicina

(A) gate na população de linfócitos (R1), estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC). (B)(C) *Dot-plot* do isotipo controle e de linfócitos T CD3⁺CD69⁺, respectivamente.

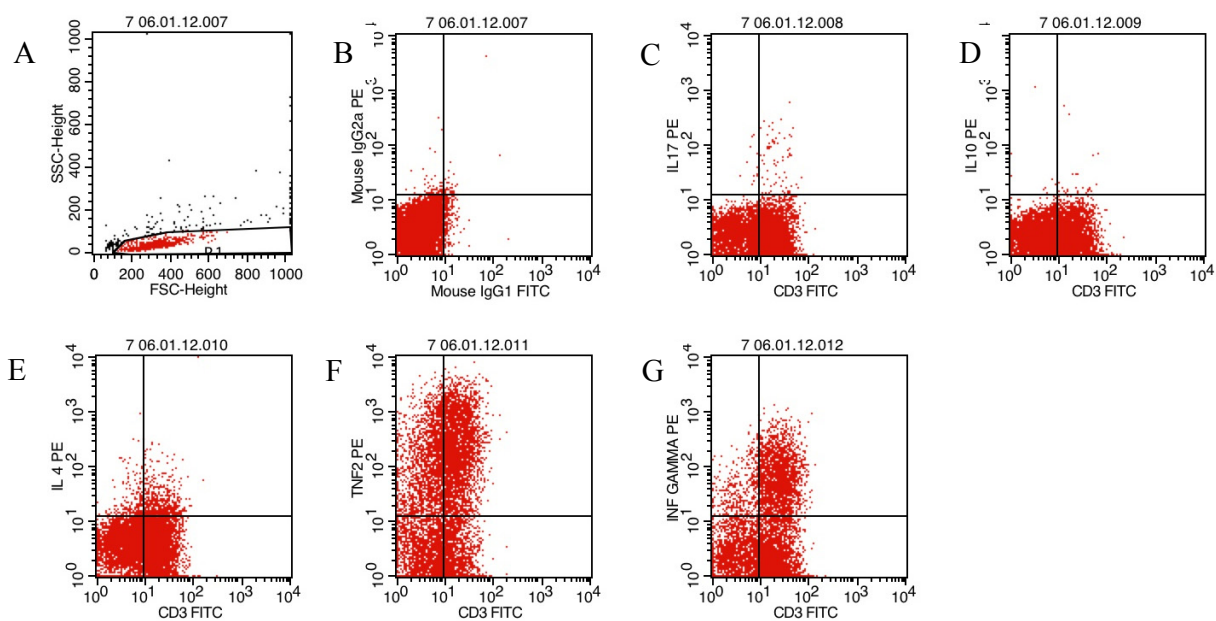
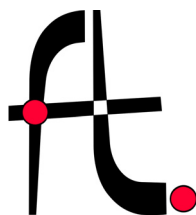


Figura B.3. Expressão de citocinas intracelulares em linfócitos estimulados com PMA e Ionomicina

(A) *Gate* na população de linfócitos estabelecida com base nos parâmetros de tamanho (FSC) e granularidade (SSC); (B) *Dot-plot* do isotipo controle; (C), (D), (E), (F) e (G) *Dot-plot* da expressão basal de citocinas em linfócito T CD3⁺ e as citocinas IL-17, IL-10, IL-4, TNF- α e IFN- γ , respectivamente.

APÊNDICE C



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

Área de Concentração: Processos de Avaliação e Intervenção em Fisioterapia

Via Washington Luís, Km 235 - C.P.676 - CEP. 13.565-905 - SÃO CARLOS - SP - BRASIL

TEL: (016) 260-8448 / 260-8341- FAX. (016) 261-2081

E.mail: ppg-cr@power.ufscar.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “Avaliação das interrelações da função cardio-respiratória e mediadores inflamatórios no Diabetes Mellitus”. Esta pesquisa tem por finalidade avaliar a influência do diabetes sobre o coração e o pulmão e a inflamação.

Inicialmente, você será avaliado por um médico cardiologista que fará eletrocardiograma e teste em esteira para detectar qualquer manifestação clínica de intolerância ao esforço que contra-indique sua participação na pesquisa.

A sua participação na pesquisa constará em coleta de sangue para exame e a um teste para avaliar o seu pulmão e coração em um aparelho que fará várias medidas em repouso e enquanto você anda em uma esteira. Antes de iniciar os testes, você receberá várias instruções e será acompanhado por uma equipe treinada que estará alerta a qualquer alteração que possa sugerir a interrupção da avaliação.

Os benefícios que podem haver com a sua participação são conhecer detalhadamente como estão funcionando o seu coração e pulmão e também contribuir para que os resultados ajudem indivíduos com diabetes. Os riscos que podem haver com a sua participação são cansaço e desconforto físico (falta de ar, boca seca e fadiga muscular) durante a avaliação. Em qualquer situação, a equipe de profissionais presentes estará pronta para lhe auxiliar.

As informações obtidas durante as avaliações serão mantidas em sigilo. Elas serão usadas, exclusivamente, para fins científicos, sem que você precise ser identificado.

Você poderá desistir de participar dos testes e da pesquisa a qualquer momento e se isso acontecer, não haverá nenhum prejuízo para você, mantendo-se o comprometimento da pesquisadora para suas eventuais necessidades.

Você receberá uma cópia deste documento e poderá se comunicar com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa nos telefones e emails abaixo. A pesquisa está de acordo com o Comitê de Ética e Pesquisa da UFSCar e caso haja qualquer dúvida você pode entrar em contato com eles através do tel: : (016) 3351-8028 e email cephumanos@power.ufscar.br ou no endereço: Via Washington Luiz, Km. 235, CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil.

São Carlos, ____ de _____ de 2010.

Assinatura do voluntário

Pesquisadores responsáveis:

 Cristina Oliveira Francisco
 (16) 3351-8705
 Email: cristinaft05@gmail.com

 Angela Merice de Oliveira Leal
 (16) 3351-8340
 Email: angelaleal@ufscar.com

ANEXO 1- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676
CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil
Fones: (016) 3351-8028 Fax (016) 3351-8025 Telex 162369 - SCUF - BR
cephumanos@power.ufscar.br
<http://www.propq.ufscar.br>

Parecer Nº. 412/2010

CAAE: 0092.0.135.000-10

Título do projeto: AVALIAÇÃO DAS INTERRELAÇÕES DA FUNÇÃO CARDIO-RESPIRATÓRIA E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NO DIABETES MELLITUS

Área de conhecimento: 4.00 - Ciências da Saúde / 4.08 - Fisioterapia e Terapia Ocupacional

Pesquisador Responsável: CRISTINA OLIVEIRA FRANCISCO

Processo número: 23112.003687/2010-6

Grupo: III

Análise da Folha de Rosto

A Folha de Rosto está completamente preenchida e devidamente assinada.

Descrição sucinta dos objetivos e justificativas

O presente estudo tem o objetivo de avaliar as inter-relações entre variáveis metabólicas e inflamatórias e a função cardiorrespiratória durante o exercício físico.

Metodologia aplicada

O estudo será realizado no Núcleo de Pesquisa em Exercício Físico (NUPEF) – Laboratório de Fisioterapia Cardiovascular do Departamento de Fisioterapia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Serão avaliados 20 diabéticos e 20 indivíduos controles saudáveis do sexo masculino com idade entre 40 e 60 anos. Os procedimentos experimentais serão conduzidos em apenas uma manhã e constarão de: coleta de sangue, testes bioquímicos no sangue coletado, prova de função pulmonar e teste cardiovascular.

Identificação de riscos e benefícios

A análise de eventuais riscos e benefícios está parcialmente adequada.

Forma de recrutamento

Para o recrutamento dos indivíduos do estudo serão utilizados meios de comunicação como rádio, internet, jornais e cartazes divulgando o estudo.

Os indivíduos que manifestarem interesse em participar do estudo, serão informados sobre o mesmo e todos os procedimentos que ele envolve. Uma vez que tenham aceito participar, será marcada uma data para formalizar a adesão por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e início das avaliações.

Os indivíduos serão encaminhados para uma avaliação inicial com médico cardiologista para avaliação clínica e da capacidade funcional do sistema cardiovascular, bem como para diagnosticar possíveis alterações como isquemia do miocárdio e/ou patologias cardiovasculares associadas que contra-indiquem a participação no presente estudo.

Parecer

As pendências apontadas no Parecer nº. 369/2010 foram satisfatoriamente resolvidas. **Projeto aprovado.** Atende as exigências contidas na Resolução 196/96, do Conselho Nacional de Saúde.

Normas a serem seguidas

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Via Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676

CEP 13.565-905 - São Carlos - SP - Brasil


Fones: (016) 3351-8028 Fax (016) 3351-8025 Telex 162369 - SCUF - BR

cephumanos@power.ufscar.br<http://www.propq.ufscar.br>

III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item III.2.e).
- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente dentro de 1 (um) ano a partir desta data e ao término do estudo.

São Carlos, 10 de novembro de 2010.


Prof. Dr. Daniel Vendruscolo
Coordenador do CEP/UFSCar